



**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS AVANZADOS
DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**

**UNIDAD ZACATENCO
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA CELULAR**

**Caracterización inicial y regulación por la vía AMPc-PKA/CREB del promotor del
gen que codifica para el transcrito divergente de *Cavγ₂/Stg* (*CACNG2-DT*)**

TESIS

Que presenta

M. en C. David Muñoz Herrera

Para obtener el grado de

DOCTOR EN CIENCIAS

EN LA ESPECIALIDAD DE BIOLOGÍA CELULAR

Director de Tesis

Dr. Diego Ricardo Félix Grijalva

Ciudad de México

Diciembre, 2023

Agradecimientos

Expreso mi gratitud al Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional (Cinvestav-IPN) y al departamento de Biología Celular por la oportunidad de realizar mis estudios de Maestría y Doctorado en la institución. Así como al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (Conacyt) por el apoyo económico brindado a través de una beca académica.

Quiero dar las gracias al Dr. Ricardo Félix Grijalva por la confianza puesta en mí, al aceptarme como parte de su equipo de trabajo y por apoyarme para la realización del proyecto de investigación plasmado en la presente tesis. A mis asesores el Dr. José Manuel Hernández Hernández y Emiliano Fernando Navarro García por sus comentarios y sugerencias que enriquecieron mi trabajo. Especialmente quiero manifestar mi gratitud a la Dra. Norma Angélica Oviedo de Anda y al Dr. Ricardo González Ramírez por su ayuda, consejos y asesoría en la parte experimental del proyecto.

De igual forma expreso mi gratitud a los iniciadores de este proyecto, la Dra. Aida Calderón Rivera y el Dr. Natanael Zarco Salinas. Al Ing. Hugo Cadena García por su apoyo técnico en el laboratorio y a la bióloga Mercedes Urban Núñez por su ayuda al trabajar con cultivos celulares. A mis compañeros de laboratorio el Alejandro Sandoval Romero, Paz Durán de Haro, Alejandra Corzo López, Margarita Leyva Leyva y Susana Ayala Chaidez, por hacer agradable el tiempo que pasé junto con ellos en el laboratorio.

Finalmente, quisiera agradecer a mi familia a Jordy por apoyarme en todo, a mis padres Antonia Herrera y José Paz Muñoz por su ayuda incondicional. Y a mis hermanos Fernanda y José Paz por creer en mí.

Contenido

Prefacio	6
Abreviaturas	8
Resumen	9
<i>Abstract</i>	10
1. Introducción	11
1.1. La familia de las subunidades CaV γ	11
1.2. Cav γ ₂ como parte de los canales Cav neuronales y de los receptores AMPA	13
1.3. La mutación <i>stargazer</i>	18
1.4. Características del gen y de la proteína	19
2. Justificación	24
3. Hipótesis	24
4. Objetivos	25
4.1. Objetivo General	25
4.2. Objetivos particulares	25
5. Materiales y Métodos	26
5.1. Análisis in silico	26
5.2. Análisis deletional y eliminación de elementos reguladores	26
5.3. Cultivo celular y transfección	28
5.4. Ensayos de luciferasa	29
5.5. Extracción de proteínas y análisis por <i>Western blot</i>	29
5.6. Amplificación rápida de extremos de ADNc (RACE)	30
5.7. Modificación en la expresión de p-CREB	31
5.8. Análisis estadístico	32
6. Resultados	34
6.1. Actividad transcripcional del promotor del gen <i>CACNAG2-DT</i> humano	34
6.2. Regulación del promotor de <i>CACNG2-DT</i> por la vía AMPc/PKA/CREB	37
6.3. Identificación experimental del TSS en el promotor del gen <i>CACNG2-DT</i>	45

7. Discusión	48
7.1. Elementos reguladores en el promotor de <i>CACNG2-DT</i>	48
7.2. Control de la transcripción de un ARN largo no codificante (<i>CACNG2-DT</i>)	48
7.3. Regulación de la actividad transcripcional por la vía AMPc/PKA/p-CREB	49
7.4. Regulación de la expresión de Cav γ ₂ /Stg por <i>CACNG2-DT</i>	52
7.5. Posibles repercusiones funcionales	55
8. Conclusiones	56
Bibliografía	57

Prefacio

Los canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje (Ca_V) acoplan la despolarización de la membrana celular con la entrada de Ca^{2+} , lo que desencadena diversas respuestas fisiológicas como la secreción de hormonas, la contracción muscular y la expresión génica. En el sistema nervioso, estas proteínas juegan un papel fundamental para la liberación de neurotransmisores. Por otro lado, los receptores glutamatérgicos de tipo AMPA median gran parte de la neurotransmisión excitatoria en el sistema nervioso, y participan en varias formas de plasticidad sináptica. Mientras que la correcta expresión de estas proteínas le permite al sistema nervioso cumplir con sus funciones altamente especializadas, su inapropiada expresión o disfunción se asocia con una variedad de trastornos neurológicos, que van desde la migraña y el dolor crónico hasta el trastorno bipolar y distintos tipos de ataxia y epilepsia.

En este contexto, $\text{Ca}_V\gamma_2$, también conocida como Stargazin o $\text{TARP}\gamma_2$, es una proteína neuronal multifuncional cuya expresión heteróloga ha mostrado inhibir la expresión funcional de los canales Ca_V , y regular el direccionamiento de los receptores AMPA a la membrana celular. Sin embargo, poco se sabe sobre los mecanismos moleculares que controlan su expresión. Estudios recientes en el promotor que codifica para $\text{Ca}_V\gamma_2$ de rata, han evidenciado dominios de interacción para diversos factores de transcripción y otros elementos reguladores de la transcripción. También se sabe que en la dirección antisentido del genoma el promotor regula la transcripción del ARNm de $\text{Ca}_V\gamma_2$, mientras que en la dirección sentido controla la transcripción de un ARN largo no codificante (ARNlnc).

En el presente trabajo de tesis se proporciona información novedosa sobre el carácter bidireccional del promotor *CACNG2* humano y su organización. Dada la presencia de sitios de unión a la proteína de unión al elemento de respuesta al AMP cíclico (AMPC), resultó razonable proponer una posible modulación mediante la activación de un receptor acoplado a proteínas G. Aquí se muestra que la actividad del promotor se ve reforzada por un activador de adenilato ciclasa, mientras que en presencia de un inhibidor de PKA, la actividad transcripcional se inhibe significativamente. Además, aquí se muestra que *CACNG2-DT* aumenta la expresión de $Ca_v\gamma_2$, proveyendo información relevante sobre los mecanismos moleculares que regulan la expresión de esta intrigante proteína sináptica.

El trabajo experimental se desarrolló en el Departamento Biología Celular (DBC) del Cinvestav. La tesis fue dirigida por el Dr. Ricardo Félix Grijalva, profesor titular del DBC, y el plan experimental se desarrolló con la asesoría de los doctores José Manuel Hernández Hernández y Emiliano Fernando Navarro García profesores del DBC; el Dr. Javier Hernández Sánchez profesor del Depto. de Genética y Biología Celular del Cinvestav y los doctores Norma Angélica Oviedo de Anda y Ricardo González Ramírez investigadores del Centro Médico La Raza del IMSS y del Hospital General Dr. Manuel Gea González, respectivamente. Los resultados dieron origen a un trabajo publicado en *Frontiers in Physiology*. Durante mi entrenamiento doctoral conté con el apoyo financiero del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología a través de una beca académica.

Abreviaturas

ADN	Ácido desoxirribonucleico
ARN	Ácido ribonucleico
ARNip	ARN interferente pequeño
ARNInc	ARN largo no codificante
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
AMPA	Receptores AMPA
AMPc	3'-5' adenosín monofosfato cíclico
<i>CACNG2-DT</i>	Transcrito divergente de <i>CACNG2</i>
Cav	Canales de calcio dependientes de voltaje
CREB	proteína de unión al elemento de respuesta a AMPc
DMEM	Medio Dulbecco modificado por Eagle
Fw	Dirección sentido
miARN	microARN
NCBI	Centro Nacional para la información en biotecnología
PBS	Solución amortiguadora salina de fosfatos
p-CREB	Forma fosforilada de CREB
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PKA	Proteína cinasa A
PMSF	fluoruro de fenil-metil-sulfonil
Rev	Dirección antisentido
RLU	Unidades relativas de luz
SDS	Dodecil sulfato de sodio
SEM	Error estándar de la media
TARP	Proteínas reguladoras del receptor AMPA transmembranal
TSS	Sitio de inicio de la transcripción
UTR	Región no traducida

Resumen

La subunidad $\text{Cav}\gamma_2$ (Stargazin o $\text{TARP}\gamma_2$) es una proteína que se expresa en diversos tipos neuronales donde inhibe la expresión funcional de los canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje Cav presinápticos y favorece el tránsito intracelular de los receptores postsinápticos AMPA hacia la membrana celular. A pesar de que las alteraciones en la expresión de $\text{Cav}\gamma_2$ se asocian con varios trastornos neurológicos, poco se conoce sobre su regulación a nivel transcripcional. Estudios recientes han mostrado que el promotor del gen *Cacng2*, que codifica para la subunidad $\text{Cav}\gamma_2$ de rata, es bidireccional y regula la transcripción de un ARN largo no codificante (ARNlnc) en la dirección antisentido. Aquí, se presentan estudios sobre el promotor del gen *CACNG2* humano en la dirección antisentido y se muestra que esta región incluye elementos funcionales de respuesta al AMPc (CRE) que regulan la expresión de un ARNlnc llamado *CACNG2-DT*. De manera interesante, la actividad del promotor aumenta con la forskolina, un activador de la adenilato ciclasa, y es inhibida por el H89, un antagonista de la proteína cinasa A (PKA). Por lo tanto, este mecanismo regulador implica la activación de receptores acoplados a proteínas G y la fosforilación de proteínas corriente abajo. De manera interesante, también se encontró que la expresión de *CACNG2-DT* puede aumentar los niveles de $\text{Cav}\gamma_2$. Tomados en su conjunto, estos datos brindan información novedosa sobre la organización del promotor del gen *CACNG2* humano, describen dominios y mecanismos que pueden mediar diversas entradas regulatorias y brindan información inicial sobre los mecanismos moleculares que regulan la expresión funcional de la subunidad $\text{Cav}\gamma_2$.

Abstract

$\text{Ca}_v\gamma_2$ (Stargazin or $\text{TARP}\gamma_2$) is a protein expressed in diverse types of neurons where it inhibits the functional expression of presynaptic voltage-gated Ca^{2+} (Ca_v) channels and favors the trafficking of postsynaptic α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole propionic acid receptors (AMPA) towards the cell membrane. Alterations in $\text{Ca}_v\gamma_2$ expression may be associated with several neurological disorders, such as absence epilepsy. However, its regulation at the transcriptional level has not been intensively addressed. It has been reported that the promoter of the *Cacng2* gene, encoding the rat $\text{Ca}_v\gamma_2$, is bidirectional and regulates the transcription of a long non-coding RNA (ARNlnc) in the antisense direction. Here, we investigate the proximal promoter region of the human *CACNG2* gene in the antisense direction and show that this region includes two functional cAMP response elements that regulate the expression of a ARNlnc called *CACNG2-DT*. Interestingly, the activity of the promoter is significantly enhanced by forskolin, an adenylate cyclase activator, and inhibited by H89, a protein kinase A (PKA) antagonist. Therefore, this regulatory mechanism implies the activation of G protein-coupled receptors and downstream phosphorylation. Interestingly, we also found that the expression of *CACNG2-DT* may increase the levels of the $\text{Ca}_v\gamma_2$ subunit. Together, these data provide novel information on the organization of the human *CACNG2-DT* gene promoter, describe modulatory domains and mechanisms that can mediate various regulatory inputs, and provide initial information on the molecular mechanisms that regulate the functional expression of the $\text{Ca}_v\gamma_2$ protein.

1. Introducción

1.1. La familia de las subunidades CaV γ

La subunidad CaV γ es una proteína integral de la membrana plasmática de la cual existen 8 variantes (CaV γ ₁-CaV γ ₈) y que, al igual que las claudinas, se agrupan dentro de una misma familia: las tetraspaninas. Estas proteínas se distinguen por tener 4 dominios transmembranales y una localización citoplasmática de sus extremos N- y C-terminal. Adicionalmente, en su primer lazo extracelular presentan un motivo glicina-leucina-triptófano (GLW), así como un par de residuos de cisteínas y varios sitios de glicosilación (Kang & Campbell, 2003; Chen *et al.*, 2007).

Las subunidades CaV γ se dividen a su vez en 3 subgrupos (Kang & Campbell, 2003). El más extenso lo integran las proteínas reguladoras del receptor AMPA transmembranal (TARPs), que se caracterizan por tener motivos de regulación en la región C-terminal (Fig. 1), como el motivo de unión al dominio PDZ (TTPV) o el motivo de unión a proteínas con nuevas isoformas de PDZ (nPIST; Chen *et al.*, 2007). CaV γ ₂, también conocida como TARP γ ₂ o *stargazin* es la más estudiada de las TARPs y se sabe que se expresa principalmente en la membrana postsináptica de las células de Purkinje, aunque también se encuentra en la membrana presináptica de otros tipos neuronales (Black, 2003; Kang & Campbell, 2003).

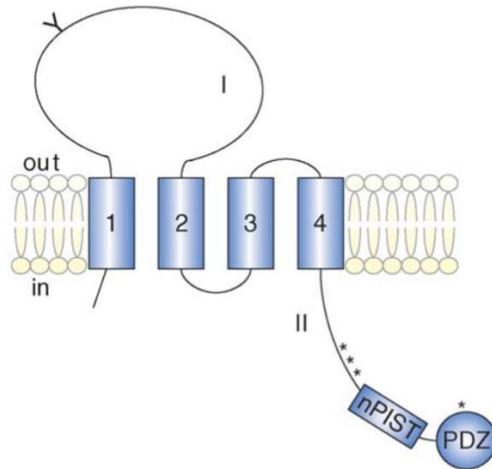


Figura 1. Estructura molecular de las subunidades Cav γ (TARPs). La proteína comprende cuatro dominios transmembrana (marcados del 1 al 4), con los extremos N- y C terminales localizados intracelularmente. Un sitio de N-glicosilación conservado en el primer bucle extracelular se indica mediante un símbolo en forma de Y. Se ha sugerido que la estructura secundaria en el primer lazo extracelular y el dominio de unión a PDZ podrían ser importantes para la asociación física y/o funcional de la proteína con el complejo de los canales Cav y otras proteínas. Los sitios de interacción con el receptor AMPA se mapearon en el primer bucle extracelular (dominio I) y la parte proximal del C-terminal (dominio II), el cual además comprende otro dominio funcional. i) Aproximadamente 30 tramos de residuos amino ricos en serinas (marcados con 3 asteriscos), que se fosforilan y desfosforilan en respuesta a la activación de los receptores NMDA durante la inducción de potenciación y depresión a largo plazo (LTP y LTD), respectivamente. ii) Un sitio de unión para la proteína enriquecida en el aparato de Golgi denominado nPIST, que dirige el complejo receptor TARP-AMPA a PSD-95 en sitios postsinápticos. iii) Un dominio de unión a PDZ que reconoce PSD-95 que contiene un residuo de treonina fosforilable por PKA que inhibe la unión de PSD-95. Modificada de Osten & Stern-Bach, 2006.

1.2. $\text{Ca}_v\gamma_2$ como parte de los canales Ca_v neuronales y de los receptores AMPA

Los canales Ca_v de alto umbral de activación (HVA, por sus siglas en inglés) son complejos multiméricos encargados de permitir el paso de los iones de Ca^{2+} al interior celular en respuesta a la despolarización membranal, con lo cual participan en la regulación de una gran variedad de eventos fisiológicos entre los que destacan la liberación de hormonas y neurotransmisores, la activación enzimática y la expresión génica. Estos canales están formados por una subunidad principal formadora del poro conductor de los iones ($\text{Ca}_v\alpha_1$) y tres proteínas (o subunidades) auxiliares llamadas $\text{Ca}_v\beta$, $\text{Ca}_v\alpha_2\delta$ y $\text{Ca}_v\gamma$ que regulan la expresión en membrana y las propiedades electrofisiológicas de la subunidad $\text{Ca}_v\alpha_1$ (Felix *et al.*, 2013; Zamponi *et al.*, 2015) (Fig. 2).

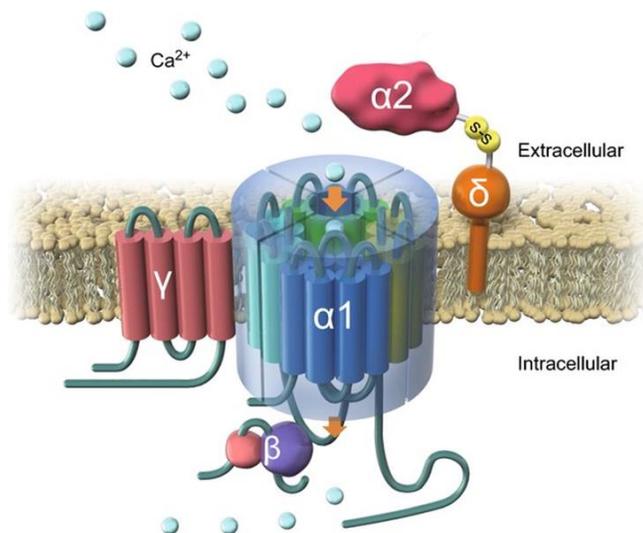


Figura 2. Estructura de los canales Ca_v de tipo HVA. El complejo del canal consta de una subunidad α_1 transmembranal formadora de poros, una subunidad α_2 extracelular unida mediante un puente disulfuro a la subunidad δ anclada a la membrana por un enlace GPI, una subunidad β intracelular y una subunidad γ transmembranal. Modificado de Ninomiya *et al.*, 2020.

De especial interés para el presente trabajo de tesis, la subunidad $\text{Ca}_v\gamma_2/\text{Stg}$ interacciona en la membrana presináptica con la subunidad $\text{Ca}_v\alpha_1$ de los canales HVA, lo que resulta en una reducción significativa de las corrientes a través de los canales (Kang *et al.*, 2001; Sandoval *et al.*, 2007) (Fig. 3), por lo que podría participar en la inhibición de ciertos los procesos biológicos desencadenados por el Ca^{2+} intracelular (Nanou & Catterall, 2018).

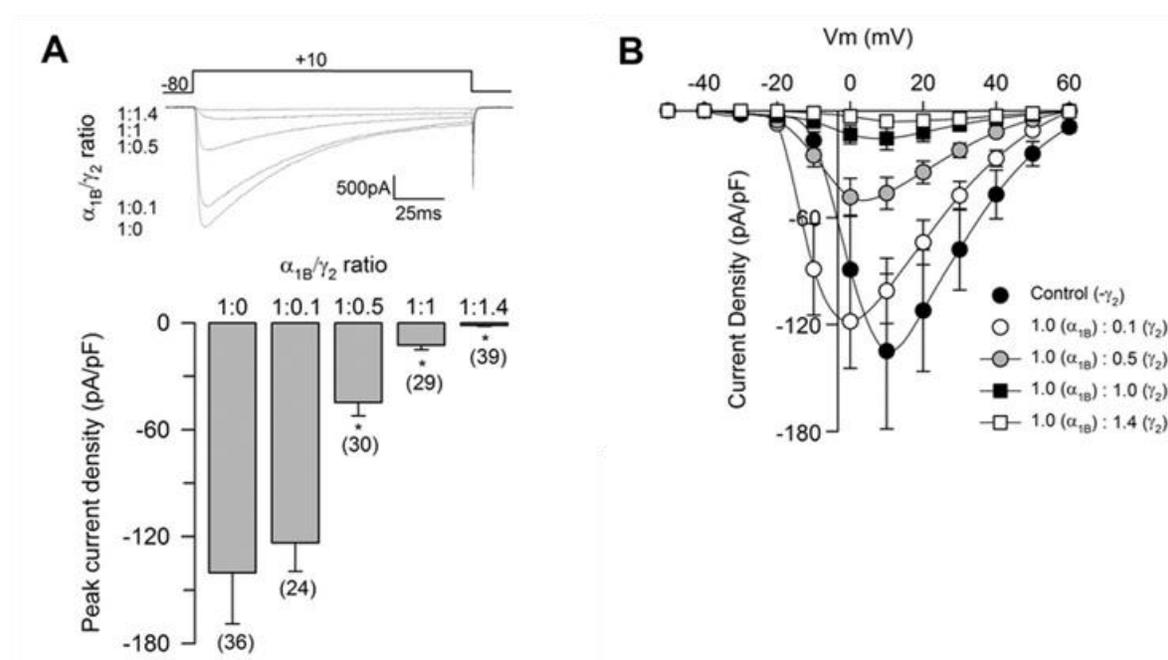


Figura 3. La subunidad $\text{Ca}_v\gamma_2/\text{Stg}$ inhibe los canales de Ca^{2+} de tipo N recombinante de manera dependiente de la concentración. A) Trazos de corriente representativos (panel superior) y comparación de la densidad de corriente máxima promedio (panel inferior) en células HEK-293 que expresan canales $\text{Ca}_v2.2$ recombinantes. Las corrientes se evocaron mediante pulsos despolarizantes a +10 mV desde un potencial de mantenimiento de -80 mV, en ausencia (1:0) y en presencia de diferentes concentraciones de ADN complementario (ADNc) de $\text{Ca}_v\gamma_2$. B) Curvas corriente-voltaje (I-V) para la densidad máxima de corriente a través de los canales $\text{Ca}_v2.2$ en células de control ($-\gamma_2$) y en células que co-expresan el ADNc de $\text{Ca}_v\gamma_2$. Modificada de Sandoval *et al.*, 2007.

En particular, se ha mostrado que la co-expresión de la subunidad neuronal $Cav\gamma_2/Stg$ reduce sustancialmente las corrientes de células enteras a través de canales $Cav2.2$ recombinantes expresados heterológicamente en células HEK-293, de riñón embrionario humano. Los datos de estos estudios sugieren que la inhibición de la expresión funcional de los canales puede implicar alteraciones importantes en las propiedades funcionales de los mismos, así como activar la respuesta de proteína desplegada (UPR) para suprimir la traducción del canal (Sandoval *et al.*, 2007).

Por otro lado, se sabe que $Cav\gamma_2/Stg$ interacciona con las subunidades GluR que conforman a los receptores AMPA glutamatérgicos (Kamalova & Nakagawa, 2021) (Fig. 4). El glutamato es el principal neurotransmisor excitatorio del sistema nervioso y actúa uniéndose a sus receptores en la membrana postsináptica, provocando su despolarización debido a la entrada de iones Na^+ (Sumioka, 2013; Pirotte *et al.*, 2013). Se sabe además que $Cav\gamma_2/Stg$ favorece el envío de los receptores AMPA a la membrana celular y que los cambios en el tráfico sináptico de éstos constituyen uno de los principales mecanismos de la plasticidad sináptica (Huganir & Nicoll, 2013).

Existen varias mutaciones de las subunidades que componen a los receptores AMPA y sus subunidades auxiliares asociadas con enfermedades humanas. Tal es el caso, por ejemplo, de una mutación *de novo* sin sentido (V143L) en el tercer dominio transmembranal de $Cav\gamma_2/Stg$ se asocia con incapacidad intelectual (Hamdan *et al.*, 2011). Esta mutación altera la interacción $Cav\gamma_2/Stg$ -AMPA, así como la amplitud y frecuencia de las corrientes postsinápticas excitadoras en miniatura (mEPSC) en

neuronas del hipocampo. Además, *Ca_vγ₂/Stg* se han identificado como locus de susceptibilidad para una subpoblación de pacientes con esquizofrenia sin déficit de atención sostenida y función ejecutiva (Liu *et al.*, 2008). Por otro lado, se ha reportado que *CACNG2* afecta significativamente la susceptibilidad al dolor crónico después de una lesión nerviosa. En particular, se ha reportado que ciertos polimorfismos de nucleótido único (SNP) del gen *CACNG2* humano están asociados con el dolor crónico en una cohorte de pacientes con cáncer que se sometieron a cirugía de mama (Nissenbaum *et al.*, 2010; Nissenbaum, 2012; Bortsov *et al.*, 2019).

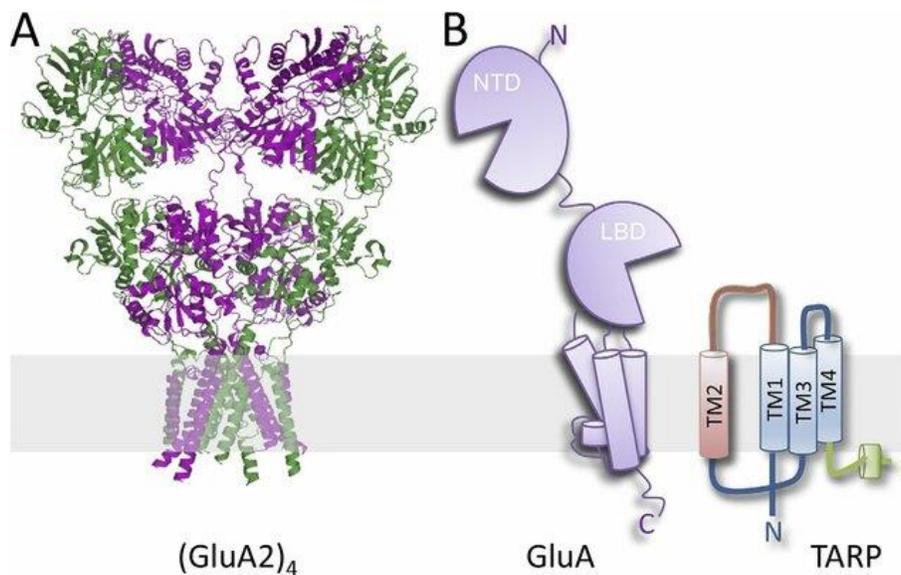


Figura 4. Estructura del receptor AMPA. A) El modelo estructural de un homotetrámero GluA2 ilustra las subunidades formadoras del poro con conformaciones distintas (púrpura, verde). B) La gráfica ilustra la topología de una subunidad formadora del poro (GluA, izquierda) y de una subunidad auxiliar (TARP, derecha). Tomado de Popescu 2015.

De manera interesante, se ha reportado que $\text{Ca}_v\gamma_2/\text{Stg}$ regula la actividad de los receptores AMPA aumentando la corriente de Na^+ , al disminuir su desactivación y desensibilización (Tomita *et al.*, 2005) (Fig. 5). Además, $\text{Ca}_v\gamma_2/\text{Stg}$ regula el tránsito de los receptores AMPA hacia la membrana celular y su direccionamiento a la postsinapsis, al interactuar con la región C-terminal de dichos receptores (Osten & Stern-Bach, 2006; Chen *et al.*, 2007; Kamalova & Nakagawa, 2021).

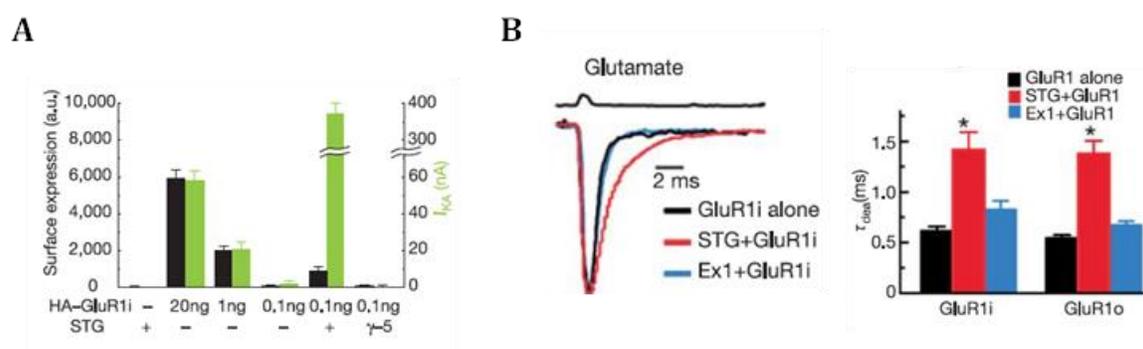


Figura 5. $\text{Ca}_v\gamma_2/\text{Stg}$ regula el envío de los receptores AMPA a la membrana y modula sus propiedades cinéticas. A) Comparación de la proporción relativa de los receptores AMPA (HA-GluR1i) expresados heterológicamente en ovocitos de *Xenopus* en presencia y en ausencia de $\text{Ca}_v\gamma_2/\text{Stg}$ (STG; barras negras). La amplitud de las corrientes de Na^+ a través de los receptores AMPA evocadas por kainato en los ovocitos inyectados se muestra en las barras verdes. $\text{Ca}_v\gamma_2/\text{Stg}$ aumenta la expresión de los receptores en la membrana, y tiene un efecto muy significativo sobre las corrientes iónicas. B) $\text{Ca}_v\gamma_2/\text{Stg}$ enlentece la desensibilización y la desactivación de los receptores AMPA. Trazos de corriente sobrepuestos registrados en ovocitos con la técnica de *patch-clamp* en la configuración de afuera hacia afuera (*outside-out*) evocados por la aplicación de glutamato en presencia y en ausencia de $\text{Ca}_v\gamma_2/\text{Stg}$ (STG). El primer dominio extracelular en $\text{Ca}_v\gamma_2/\text{Stg}$ (Ex1) se usó como control (panel izquierdo). Las corrientes se normalizaron con respecto a su amplitud máxima para comparar su curso temporal, y se observa que la presencia de $\text{Ca}_v\gamma_2/\text{Stg}$ desacelera la desactivación de los receptores AMPA (τ_{dea}) mientras que Ex1 no afecta la cinética de las corrientes (panel derecho). Modificado de Tomita *et al.*, 2005.

También se ha visto que la interrupción de la interacción del ectodominio de $\text{Ca}_v\gamma_2/\text{Stg}$ con los receptores AMPA altera la amplitud y la forma de las respuestas sinápticas en el hipocampo, lo cual sugiere una función crucial para esta proteína en el control de la eficacia de la transmisión sináptica en el cerebro (Tomita *et al.*, 2005).

1.3. La mutación *stargazer*

El ratón *stargazer* es un modelo animal que, por su fenotipo, se emplean para el estudio de varios desordenes neuronales, entre los que destaca la epilepsia con crisis de ausencias. Estos ratones de manera natural no expresan la subunidad $\text{Ca}_v\gamma_2/\text{Stg}$ debido a una mutación espontánea en el gen *Cacng2*, que codifica para dicha proteína (Letts *et al.*, 1999; Sharp *et al.*, 2001) (Fig. 6). La mutación introduce un codón de paro que origina una proteína truncada no funcional. Además, los ratones no presentan receptores AMPA funcionales en las células de la granulosa del cerebelo (Kang & Campbell, 2003). Lo anterior, reafirma la importancia de la subunidad $\text{Ca}_v\gamma_2/\text{Stg}$ en la señalización neuronal, y resalta las consecuencias que provoca su ausencia. Así, el ratón *stargazer* ha mostrado ser un modelo animal excepcionalmente informativo. Con la eliminación de una pequeña proteína, la $\text{Ca}_v\gamma_2/\text{Stg}$, del cerebro, se pueden materializar numerosos trastornos, incluidos la epilepsia con crisis de ausencia y la ataxia cerebelosa (Letts *et al.*, 1998; Felix, 2002; Letts, 2005).

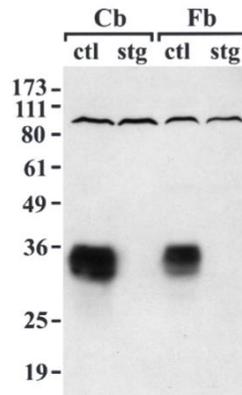


Figura 6. Ausencia de la proteína Cav γ ₂/Stg en los ratones *stargazer*. La imagen muestra el análisis por *Western blot* a partir de homogenados de cerebelo (Cb) y cerebro anterior (Fb) en ratones control (ctl) y *stargazer* (stg). Los homogenados se resolvieron en geles de poliacrilamida, se transfirieron a membranas nitrocelulosa y se incubaron con un anticuerpo específico para Cav γ ₂/Stg. Modificado de Letts *et al.*, 1998.

1.4. Características del gen y de la proteína

El gen *CACNG2* tiene un tamaño de ~142 Kb y se localiza en la cadena antisentido del brazo largo del cromosoma 22, específicamente en la banda 22q.12.3. El gen da lugar a un transcrito de ~2.4 Kb con 4 exones que una vez traducido da lugar a una proteína (Cav γ ₂/Stg) de 323 aminoácidos, con un peso molecular de ~36 KDa. Aunque, hasta ahora el promotor del gen *CACNG2* de humano no ha sido caracterizado, recientemente se reportó un análisis funcional del promotor del gen *Cacng2* de rata (ortólogo de *CACNG2*). Esto se logró mediante la clonación de una secuencia de ~1.5 Kb que flanquea el inicio de *Cacng2*, en el vector pGL4.10 que contiene al gen de la luciferasa como reportero, y midiendo la actividad transcripcional de diversas construcciones en ensayos de luciferasa, después de transfectarlas en células HT-22 de hipocampo de ratón (Corney *et al.*, 2018). Así, los

autores del trabajo identificaron tres regiones represoras en la secuencia clonada, una distal en el extremo 5' que contiene una región CaRE (Calcium Regulatory Element), otra con 4 sitios REST (a los que se une el factor de transcripción de silenciamiento RE-1) y una región represora localizada río abajo del extremo 3' (Fig. 7A). Además, los autores encontraron una secuencia STR (*Short Tandem Repeat*) de repetidos de guanina y adenina (GA), cuyo número modifica la transcripción. La existencia de varios sitios que regulan la expresión de *Cacng2* es un indicio de la importancia funcional que tiene esta proteína en la sinapsis.

Corney y sus colaboradores también reportaron que el promotor del gen *Cacng2* presenta una organización bidireccional (Fig. 7B), y que en dirección antisentido podría estar regulando la expresión de dos transcritos de un ARNinc, (Corney *et al.*, 2018).

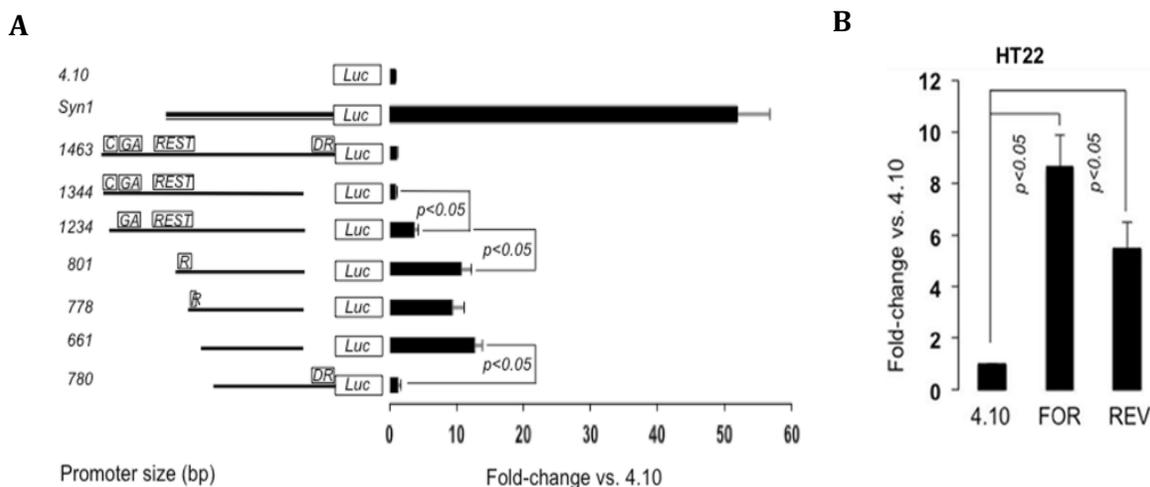


Figura 7. Análisis funcional de la actividad transcripcional del promotor de *Cacng2*. A) Niveles de expresión de las diferentes construcciones del promotor de *Cacng2* que codifica para Cav γ ₂/Stg de rata. Se identificaron 3 regiones represoras, siendo la construcción que carece de estas secuencias (661 pb) la que presentó mayor actividad transcripcional. La posición de las regiones/elementos se señala con rectángulos: Luc,

gen de la luciferasa; C, elementos CaRE; DR, región represora río abajo; GA, secuencia STR de GA; REST y R, región completa o parcial donde se localizan los elementos REST. La actividad del promotor del gen *Syn1* de ratón se usó como control positivo y el vector pGL4.10 vacío como control negativo. B) Actividad bidireccional del promotor del gen *Cacng2*. Los experimentos se realizaron en células HT22 transfectadas con una construcción de la región promotora de 801 pb en dirección sentido (FOR) y antisentido (REV) del promotor clonado en el vector pGL4.10. La actividad transcripcional se determinó por ensayos de luciferasa, y los resultados indican que dicho promotor tiene actividad en ambas direcciones. Modificado de Corney *et al.*, 2018.

Por otro lado, y tomando en consideración los antecedentes presentados en los párrafos precedentes, en nuestro laboratorio se procedió a identificar y clonar la región promotora proximal del gen de humano *CACNG2*. Como resultado se obtuvo una construcción de ~1.6 Kb que se clonó en el vector reportero pGL3-basic. Esta construcción se expresó en células de neuroblastoma de ratón (N1E-115) y de humano (SH-SY5Y) para determinar su actividad transcripcional tanto en dirección sentido como antisentido. El análisis de estas construcciones mostró que existía actividad en ambas direcciones, incluso la actividad en dirección antisentido resultó 4 veces mayor que en dirección sentido (Muñoz-Herrera, 2018; Fig. 8).

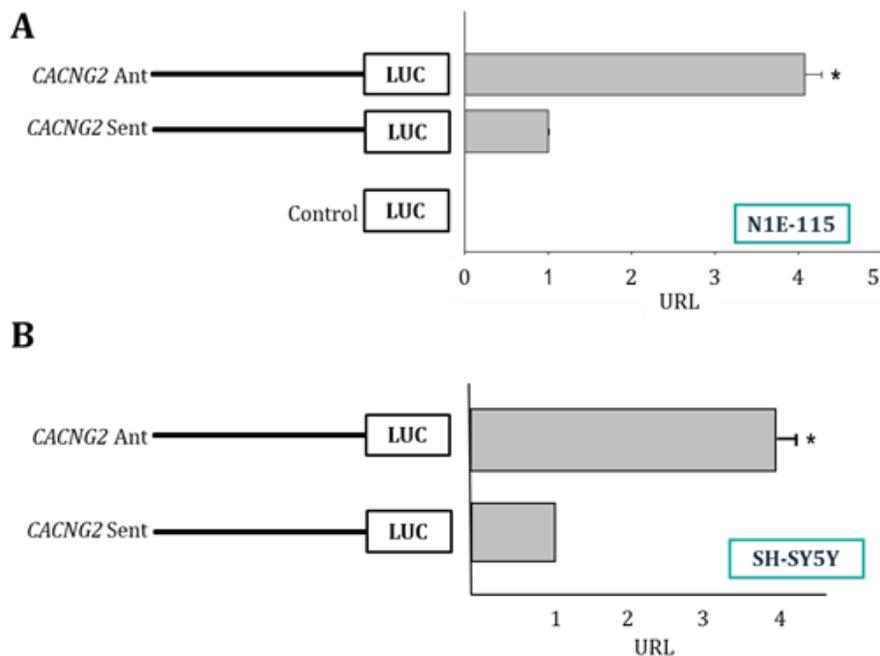


Figura 8. Actividad transcripcional del promotor del gen *CACNG2*. Los ensayos de luciferasa se realizaron a partir de una construcción de ~1.6 kb que contienen la secuencia del promotor del gen *CACNG2* clonada en las direcciones sentido y antisentido en el vector pGL3-basic expresada en células N1E-115 (A) y SH-5YSY (B). Los datos (no publicados) muestran el promedio \pm el error estándar de la media de al menos tres determinaciones independientes de la actividad transcripcional mediada en unidades relativas de luz (URL).

Vale la pena mencionar aquí que, en la base de datos Ensembl (<https://www.ensembl.org/index.html>) se ha reportado que en dicha dirección se localiza el gen *CACNG2-DT* que da origen a un ARN no codificante de 632 pb, que por su tamaño podría tratarse de un ARNlnc. Estas moléculas son ARNs no codificantes de una longitud mayor a 200 pb, cuya función depende de su localización subcelular. En el núcleo, los ARNlncs ayudan a mantener los territorios cromosómicos y actúan como reguladores transcripcionales. En el citoplasma estas secuencias actúan directamente sobre los ARNm, inhibiendo su traducción o

acelerando su degradación, o uniéndose a microARNs (miARNs) que impiden la traducción de los ARNs (Bushati & Cohen, 2007; Hombach & Kretz, 2016; Bridges *et al.*, 2021).

2. Justificación

La proteína Cav γ ₂/Stg juega un papel muy relevante en la señalización nerviosa dado que se asocia con los canales de Ca²⁺ y con los receptores glutamatérgicos de tipo AMPA. Se sabe que las alteraciones en su expresión funcional pueden dar lugar a trastornos neurológicos tan devastadores como la epilepsia con crisis de ausencia. Sin embargo, y a pesar de su relevancia aparente, la regulación en la expresión de Cav γ ₂/Stg no se ha estudiado con detalle. Por ello resulta relevante conocer su regulación a distintos niveles, incluyendo la expresión transcripcional.

3. Hipótesis

Dado que la construcción antisentido de una secuencia río arriba de la región 5'UTR del gen *CACNG2* muestra actividad transcripcional, resulta razonable hipotetizar que la secuencia contiene un promotor bidireccional cuya actividad codifica para un gen (*CACNG2-DT*) que da origen a un ARNInc.

4. Objetivos

4.1. Objetivo General

Caracterizar funcionalmente la actividad transcripcional del promotor del gen *CACNG2-DT*.

4.2. Objetivos particulares

1. Corroborar la naturaleza bidireccional del promotor del gen *CACNG2* humano y determinar en qué dirección se favorece la transcripción.
2. Caracterizar la actividad transcripcional de las construcciones del promotor del gen *CACNG2-DT* clonadas en el vector pGL3-Basic.
3. Localizar los sitios de unión a factores de transcripción relevantes en las secuencias del promotor del gen *CACNG2-DT*.
4. Estudiar si la actividad del promotor se regula por AMPc y de ser así, estudiar los determinantes moleculares que median esta regulación.
5. Identificar experimentalmente el sitio de inicio de la transcripción del gen *CACNG2-DT*.

5. Materiales y Métodos

5.1. Análisis in silico

La secuencia del promotor del gen *CACNG2-DT* se determinó alineando una región 5'UTR de 1.6 kb del gen *CACNG2* y la secuencia *CACNG2-DT* depositada en *The National Center for Biotechnology Information* (NCBI; Gene ID: 105373021), utilizando el *software* Align Sequences Nucleotide BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). La ubicación del sitio putativo de inicio de la transcripción (TSS) se logró utilizando la herramienta de predicción de promotores de redes neuronales disponible en el sitio de internet del Proyecto del Genoma de *Drosophila* de Berkeley (http://www.fruitfly.org/seq_tools/promoter.html). La presencia de la caja TATA y los posibles sitios de unión para factores de transcripción y otros elementos reguladores relevantes se determinaron utilizando la herramienta Genomatix MatInspector (<https://www.genomatix.de/>). Finalmente, se realizó un análisis de la secuencia con la herramienta Jaspar2022 (<https://jaspar.genereg.net/>) para identificar posibles sitios de unión del factor de transcripción CREB.

5.2. Análisis delecional y eliminación de elementos reguladores

A partir de la secuencia promotora proximal de 1.3 kb del gen *CACNG2-DT*, se obtuvieron diferentes construcciones (llamadas A, B y C) y combinaciones de ellas (AB y BC) mediante PCR, las cuales se clonaron en el vector pGL3-Basic (Promega) (Tabla 1). La contribución de los TSS putativos y de los sitios CREB a la actividad

del promotor se evaluó mediante mutagénesis dirigida utilizando el paquete comercial de mutagénesis sitio-dirigida QuikChange II XL (Agilent Technologies) usando oligonucleótidos específicos (Tabla 2). La clonación del promotor en los vectores, la eliminación de los elementos reguladores y la localización de los TSS se corroboraron mediante el alineamiento de las secuencias con la secuencia del promotor *CACNG2-DT* en la base de datos del NCBI utilizando el *software* AlingX del paquete de bioinformática Vector NTI Advance 11.5.0 (Invitrogen). Todas las construcciones utilizadas en este estudio se secuenciaron automáticamente.

Tabla 1. Oligonucleótidos utilizados para el análisis delecional del promotor del gen *CACNG2-DT*. El extremo poli(T) y los sitios de escisión añadidos para las endonucleasas *XhoI* y *HindIII*, para oligonucleótidos en dirección sentido (Fw) y antisentido (Rev), respectivamente, están subrayados en la secuencia.

Construct	Base pair (Start → End positions)	Oligo	Sequence (5' → 3')
<i>CACNG2-DT</i> promoter	1304 bp (-1281 → +23)	A Fw C Rev	<u>TTTTTCTCGAGCACCCAACCGACTTCTGGTT</u> <u>TTTTTAAGCTTCTCTGGGCACGTAGAGATGG</u>
A	414 bp (-1281 → -868)	A Fw A Rev	<u>TTTTTCTCGAGCACCCAACCGACTTCTGGTT</u> <u>TTTTTAAGCTTATGGTGTGAGAATTCGGCT</u>
B	450 bp (-867 → -418)	B Fw B Rev	<u>TTTTTCTCGAGTTCTCATGGTCGGGACCTAGACA</u> <u>TTTTTAAGCTTGCCACCCCTGCAGCAAGACG</u>
C	440 bp (-417 → +23)	C Fw C Rev	<u>TTTTTCTCGAGCGCGCGCCTGCCCCCACTC</u> <u>TTTTTAAGCTTCTCTGGGCACGTAGAGATGG</u>
AB	864 bp (-1281 → -418)	A Fw B Rev	<u>TTTTTCTCGAGCACCCAACCGACTTCTGGTT</u> <u>TTTTTAAGCTTGCCACCCCTGCAGCAAGACG</u>
BC	890 bp (-867 → +23)	B Fw C Rev	<u>TTTTTCTCGAGTTCTCATGGTCGGGACCTAGACA</u> <u>TTTTTAAGCTTCTCTGGGCACGTAGAGATGG</u>

Tabla 2. Oligonucleótidos utilizados para la eliminación de los sitios de unión a CREB (CRE) y los TSS.

Site	Oligo	Sequence (5' → 3')
CREB.1	Fw	GACCAGACTTCCCAGTATTCTGCCCTTGAGCT
	Rev	AGCTCAAGGGCAGAATACTGGGAAGTCTGGTC
CREB.2	Fw	GAATATGGAGAGTTATAAAAAAAGGAGAAAGCTCACGGAAAAGAGTG
	Rev	CACTCTTTTCCGTGAGCTTTCTCCTTTTTTTATAACTCTCCATATTC
CREB.3	Fw	GGGAAGAGGCTTGCCTTTTAGAAACTGTTCCAGT
	Rev	ACTGGAACAGTTTCTAAAAGGCAAGCCTTCTCCC
CREB.4	Fw	CCCAGTATTCTGTAAGCCCTTAGCTGCACAGGTG
	Rev	CACCTGTGCAGCTAAGGGCTTACAGAATACTGGG
CREB.5	Fw	GGCGGCGGTTATTGTTGTTGGGGGTAGTG
	Rev	CACTACCCCAACAACAATAACCGCCGCC
TSS3	Fw	CTCCTGGGCTCCCCTTAGAGGAAGGC
	Rev	GCCTTCCTCTAAGGGGAGCCCAGGAG
TSSRace	Fw	GCTCAGCCTCCTTCCATCTCTACGTGCC
	Rev	GGCAGGTAGAGATGGAAGGAGGCTGAGC

5.3. Cultivo celular y transfección

Las transfecciones transitorias se realizaron en la línea celular N1E-115 ATCC obtenida de la ATCC (*American Type Culture Collection*) y que se derivó originalmente de un neuroblastoma de ratón. Las células se cultivaron en medio DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*), suplementado con SFB (suero fetal bovino) al 10 %, penicilina 100 U/mL, estreptomycin 100 µg/mL y L-glutamina 2 mM. Donde se indica, los experimentos se realizaron en células de neuroblastoma humano SHSY-5Y (ATCC) mantenidas en medio DMEM suplementado, como se mencionó anteriormente, más piruvato de sodio 10 µL/mL. Ambas líneas celulares se mantuvieron en cultivo a 37°C en una atmósfera con 5% de CO₂. Las células se mantuvieron en cultivo al 80% de confluencia y se transfectaron 48 h antes de ser utilizadas, utilizando el Reactivo Lipofectamine 2000 (Invitrogen) de acuerdo con las indicaciones del fabricante.

5.4. Ensayos de luciferasa

Las construcciones clonadas en el vector pGL3-Basic se transfectaron en células N1E-115 junto con el plásmido pRSV- β gal (Promega). El vector pGL3-Basic contiene la secuencia codificante de la luciferasa de *Photinus pyralis*, pero carece de promotor. El plásmido pRSV- β gal contiene la secuencia codificante de la β -galactosidasa, que se utilizó para normalizar los resultados en función de la eficiencia de la transfección. Se usó el paquete comercial *Luciferase Assay System* (Promega) para el ensayo.

5.5. Extracción de proteínas y análisis por *Western blot*

Las células se lavaron con PBS y se incubaron en *buffer* de lisis (SDLB) que contenía 250 mM Tris-HCl [pH 8], 750 mM NaCl, 5% Triton x-100, 1 mM fluoruro de fenilmetil-sulfonil (PMSF) y el cocktail inhibidor de proteasas Complete 1X (Roche Diagnostics). A continuación, las células se incubaron a 4°C durante 30 min, se centrifugaron y las proteínas del sobrenadante se cuantificaron utilizando el reactivo *Protein Assay Dye Reagent Concentrate* (Bio-Rad). Los niveles de expresión de proteínas se determinaron mediante inmunoelectrotransferencia (*Western blot*). Para ello, se desnaturalizaron 50 μ g de proteínas en *buffer* de Laemmli a 95°C durante 5 min. Las muestras se analizaron mediante electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio (SDS-PAGE) al 10% y las proteínas se separaron utilizando un *buffer* de electroforesis que contenía 0.025 M Tris-Base, 0.192 M glicina y 0.1% de SDS). A continuación, las proteínas se transfirieron en cámara semiseca a membranas de nitrocelulosa. Las membranas se lavaron con *buffer* TBST y la unión

no específica se bloqueó usando TBST con leche (5%). A continuación, las membranas se incubaron durante toda la noche con anticuerpos primarios anti-CREB (1:1000; Cell Signaling), anti-p-CREB (1:1000; Cell Signaling), anti-Cav γ ₂/Stg (1:1000; Santa Cruz Biotechnology), o anti- β -actina (1:10.000, GeneTex) diluidos en TBST. A continuación, las membranas se lavaron con TBST y se incubaron con los anticuerpos secundarios anti-ratón (1:5000; Jackson immunoresearch) o anti-conejo (1:5000; Jackson immunoresearch) acoplados a peroxidasa de rábano picante durante 1 h. Finalmente, las membranas se revelaron utilizando el reactivo *Immobilon Western* (Millipore). La señal de quimioluminiscencia se detectó con el paquete comercial *Odyssey Fc* (LI-COR).

5.6. Amplificación rápida de extremos de ADNc (RACE)

Esta técnica se utilizó para determinar el TSS en el promotor *CACNG2-DT*, empleando el paquete comercial *5'RACE System for Rapid Amplification of cDNA Ends* (Invitrogen) a partir de muestras de ARN total aisladas de células SHSY-5Y (ATCC) y cerebelo humano (obtenidas del Banco de Cerebros de Cinvestav; <https://cgse.cinvestav.mx/Banco-Nacional-de-Cerebros>; protocolo No. 2023-1-CB) empleando el reactivo TRIzol (Ambion). Para la retrotranscripción y la subsecuente reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR) se utilizaron oligonucleótidos dirigidos contra *CACNG2-DT* (Tabla 3) y el amplicón se clonó en el vector pCRTM2.1-TOPO.

Tabla 3. Oligonucleótidos utilizados en la técnica 5'RACE.

Oligonucleótido	Secuencia (5' → 3')
GSP1 ALO	GTCCAGGTTACATGTT
GSP2 ALO	TTCCAGGCAGAGAAAC
NGSP ALO	GTTGAAGTTTTGTGCC

5.7. Modificación en la expresión de p-CREB

Los niveles de CREB fosforilado (p-CREB) se aumentaron siguiendo tres métodos diferentes. La primera consistió en estimular la fosforilación de CREB al tratar las células con 8-Br-AMPC (3 mM, Sigma-Aldrich). La segunda fue transfectar las células con una construcción con la secuencia codificante de CREB1 de humano (pcDNA3-CREB1, donado por la Dra. Norma Oviedo, CMN La Raza, IMSS) para aumentar la cantidad de CREB disponible para ser fosforilado. Y tercero, mediante el tratamiento de las células con un activador de la adenilato ciclasa, la forskolina (FSK; Sigma-Aldrich). En este caso, se dio un pretratamiento durante 2 h con el activador de la AC a concentración final de 10 μ M. Se continuó con la transfección, de manera similar a lo hecho con otras condiciones, y las células se trataron con FKS a la misma concentración por ~40 h.

Por otro lado, la disminución en la cantidad de p-CREB se logró tratando las células con un inhibidor de la Proteína cinasa A (PKA), el H89 (Sigma-Aldrich) a una concentración de 10 μ M. O bien, se indujo el silenciamiento (*knockdown*) del factor de transcripción mediante la transfección de dos ARNip (*small interference RNAs*) específicos contra CREB (Sigma-Aldrich, Tabla 4) y ARNip no específicos o *scramble* (Santa Cruz Biotechnology) como control negativo.

Tabla 4. ARNip utilizados para el silenciamiento de CREB.

Oligo	Site	Sequence
<i>siRNA CREB 1a</i>	CREB binding site	5'-CAGCCAUCAGUUAUUCAGU-3' 5'-ACUGAAUAACUGAUGGCUG-3'
<i>siRNA CREB 1b</i>	CREB binding site	5'-GAGCAAUACAGCUGGCUAA-3' 5'-UUAGCCAGCUGUAUUGCUC-3'

5.8. Análisis estadístico

Los datos se analizaron usando el *software* GraphPad Prism 8.0.2 software (GraphPad Software). Los resultados se presentan como la media \pm el error estándar de la media (SEM). Para comparar dos grupos se utilizó la prueba t de Student, mientras que para el análisis de datos de varios grupos se utilizó ANOVA seguido de la prueba *post-hoc* de Tukey. Las diferencias se consideraron estadísticamente significativas con valores de $p < 0.05$.

La normalización de los datos en los ensayos de luciferasa se realizó de la siguiente manera, considerando que se utilizaron dos sistemas de expresión diferentes. En el primer caso, las células se transfectaron con una construcción consistente en un vector que utiliza como gen reportero la luciferasa de luciérnaga *Photinus pyralis* (pGL3-Basic), donde se clonó el promotor del gen *CACNG2-DT*. Paralelamente, las células se cotransfectaron con un vector vacío (sin el promotor de interés) que solo expresa la luciferasa del pensamiento marino *Renilla reniformis* como gen reportero, que se utilizó para normalizar los datos y así eliminar la eficiencia de la transfección como una variable. El segundo sistema utilizó la misma construcción que contiene la luciferasa de *Photinus* como gen reportero y el promotor de *CACNG2-DT*; sin embargo, en este caso las células se cotransfectaron con un vector vacío que dirige la

expresión de la enzima β -galactosidasa, que, al igual que en el caso anterior se utilizó para normalizar los datos con el mismo propósito de eliminar como variable la eficiencia de la transfección. Por lo tanto, hay que tener en consideración que después del análisis de los datos, la escala de las gráficas correspondientes difiere en varios órdenes de magnitud debido a la naturaleza del proceso de normalización. Los resultados de estos experimentos se muestran como gráficas de barras que muestran además la dispersión de los datos experimentales.

Tabla 5. Método de normalización de datos utilizado en los ensayos de evaluación de la actividad transcripcional.

Figura(s)	Vector transfectado	Normalizado con
12		Luciferasa de <i>Renilla reniformis</i>
10B, 11, 14, 16B 18	pGL3-Basic	β -galactosidasa

6. Resultados

6.1. Actividad transcripcional del promotor del gen *CACNAG2-DT* humano

Estudios previos mostraron que el promotor del gen *Cacng2* de rata tiene actividad bidireccional y que la diferenciación de las células de la línea HT22 derivadas del hipocampo de ratón con AMPc aumenta los niveles de ARNm tanto de *Cacng2* como de la transcripción divergente *Cacng2-DT*, que es un ARNlnc (Corney *et al.*, 2019). Por lo tanto, en el presente trabajo de tesis se buscó estudiar con detalle el promotor humano del gen que codifica para *CACNG2-DT*.

Para ello, inicialmente se realizó un análisis *in silico* con el fin de identificar elementos que pudieran estar regulando su actividad. A continuación, el ADN de interés ubicado entre los nucleótidos 36702595 y 36703898 de la secuencia de referencia en la base de datos NCBI (RS_2023_03) se clonó en el vector pGL3-Basic. La región clonada tiene un tamaño de 1304 pb, donde 1158 corresponden a la región 5'UTR del gen *CACNG2*; una región intergénica de 123 pb y una pequeña secuencia de 23 pb del exón 1 del gen *CACNG2-DT*. De manera interesante, también se encontró una caja TATA ubicada en las posiciones -1147 y -1133, así como tres nucleótidos ubicados en las posiciones -1114, -978 y -150 que podrían actuar como TSS. Por último, también se identificó una isla CpG, una característica común de los promotores bidireccionales, entre los nucleótidos -643 y -278 (Fig. 9). El número de identificación del gen *CACNG2-DT* en la base de datos del NCBI es 10537302.

```

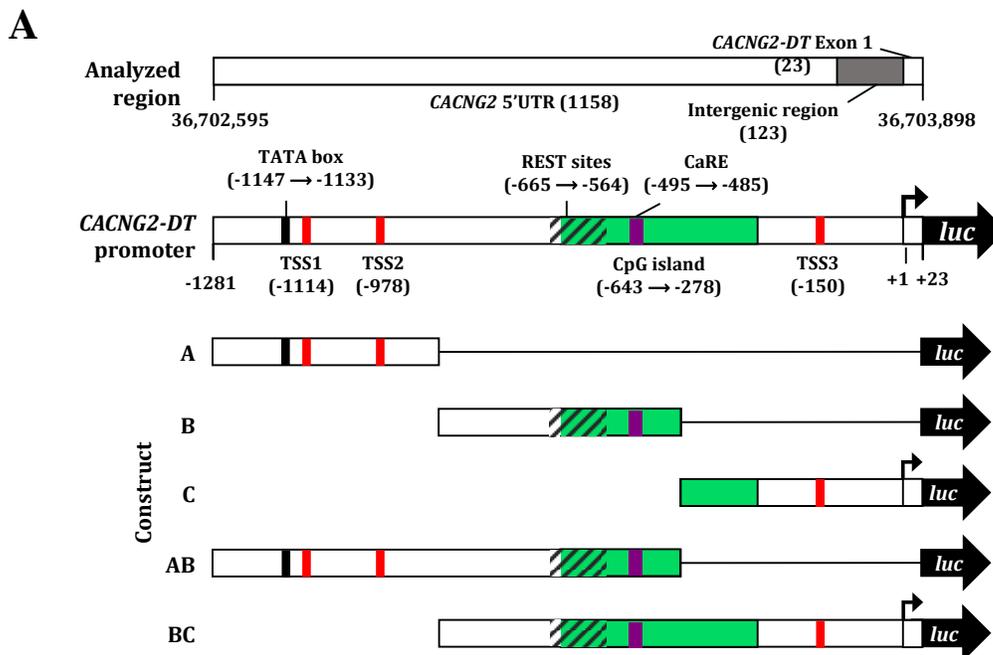
-1281   caccacaaccg acttctgggt ctcgggagag tgtgtgtgag ggtgcaagta ctaaagccaa aaaaaataaa taaaaataaa
-1201   aattattcca ctactaatat aatggatata tgtatgaata gagaatatgg agagttataa aaaaaggag gtaagaagc
                                     TATA box CRE.2
-1121   tcacggaaaa gagtgtaaat tataaagatc acacgggaag aggcttgccct tttgagatca gaaactgttc cagttgcagt
      TSS1
-1041   gttttttttt taaaaagaaa aggaaaaaaa aaataaaaag acacccccca ccccccaag tgagatccct taatctcttt
                                     CRE.3 TSS2
-961    ttctaaaatt ctggtctcca gtttccatat gtgatagtta atttggagat ggcttcaca gtgaaccagg gaacagccga
-881    attctcaaca ccatttctca tggctcgggac ctgacagtt agagactgtg agagccgaga tgcaaccttc ggtcttcggt
-801    ctcggctctg cggcctcgcg catgaaaatc ctttgcttcg ccagttctct tccttggggg gtctcggcgc tttcgtttca
-721    gaccagactt ccagatattc tgtaagccct tgagctcagc tgcacagtg cgggggtctc gctttccatg gttttgcccg
                                     CRE.1 CRE.4 REST
-641    ggcagcggcg gcggcggcgg cggcggcggc agggcgggca ggcgcgcgcg cggcggcggc agcaggacga gcagcggcgg
      REST
-561    cggttattgt tgttgggtggc ggggtagtg ttggcgaagt gggggagaga gggggtttct cctggagaat cgaggcggat
      CRE.5 CaRE
-481    ttccctcccc ctatctgcaa agctcctgga aacgaggag ccggcgctct gctgcagggt gggccgcgcg cctgcccccc
-401    actcgtacc ggctgggagc ccgaggagc gctccacct actgcattac gggtgggtgct gaaccggaca gctccctgcg
-321    ccgccgctc cgcgcgctc ccgctggct cccagggcc cccgccagga ggggggcgct ggccagagtc ctccctcccc
-241    ggggcagcaa ggccagcgca gagcgggggc cgcctttct ctttttacc ctctcccaa tcctaaaatg agcgtctcc
-161    tgggctcccg gagcttagag gaaggcgtag ctgagatag ctcgcgctct ctctctctct ctctctctct ctctctctct
      TSS3
-81    ctctcttct ctctctctct ctctctctct ctccccctt cctcccccc ttggtgtttc ttcagctca gcctcttct
-1     cattccatct ctacgtgcc agag
      TSSRace

```

Figura 9. Secuencia de nucleótidos del promotor del gen *CACNG2-DT*. Los sitios de unión del factor de transcripción CREB, los dominios múltiples represores de REST y el sitio de unión al factor de transcripción CaRE están subrayados. También se representan las señales putativas para la maquinaria de transcripción basal (caja TATA, TSS). El cuadro verde enmarca la isla CpG.

Posteriormente se realizó un análisis de eliminación mediante la clonación del promotor de longitud completa o varios fragmentos más cortos en el vector pGL3-Basic (Fig. 10A) y su actividad transcripcional se determinó utilizando ensayos de luciferasa como se ha descrito previamente (Martínez-Hernández *et al.*, 2013). Los resultados de este análisis muestran que todas las construcciones tienen una actividad transcripcional más baja que la secuencia promotora completa. Esto fue

estadísticamente significativo en todos los casos excepto en el de la construcción C (Fig. 10B). Aquí, vale la pena mencionar que el TSS encontrado experimentalmente en el presente trabajo (ver más adelante) está ubicado en la construcción C. Sin embargo, y de manera inesperada, la construcción BC exhibió una actividad transcripcional significativamente menor, a pesar de contener la secuencia completa de la construcción C. Aunque la razón de este hallazgo aún no se conoce, ésta podría estar relacionada con la presencia de elementos represores de la transcripción presentes en la construcción B. De hecho, el análisis *in silico* del promotor reveló múltiples dominios represores, incluida una serie de elementos REST y un sitio de consenso de unión al elemento regulador dependiente de Ca^{2+} (CaRE) (Fig. 9; Tabla 6).



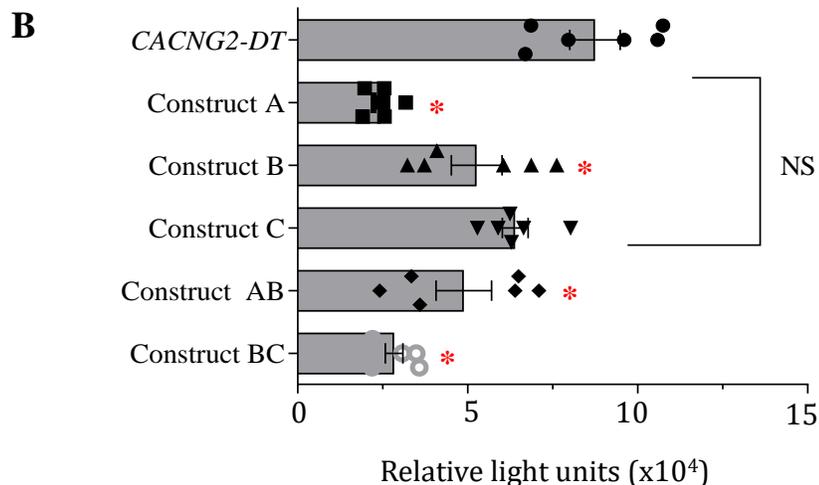


Fig. 10. Análisis delecional y localización de TSS en el promotor del gen *CACNG2-DT*. A) Esquema que representa varios elementos reguladores en *CACNG2-DT*. B) Análisis delecional que muestra que todas las construcciones del promotor analizadas tienen una actividad transcripcional más baja que el promotor completo, excepto la construcción C. Los asteriscos denotan diferencias estadísticamente significativas (ANOVA; $P < 0.05$; $n = 6$).

Tabla 6. Secuencia y posición relativa de los elementos/regiones REST y CaRE.

Site / Element	Base pair (Start → End positions)	Sequence (5' → 3')
REST (1)	22 bp (-665 → -644)	TCTCGCTTTCCATGGTTTTGCC
REST (2)	25 bp (-646 → -622)	GCCCGGGCAGCGGGCGGGCGGGCGGG
REST (3)	25 bp (-643 → -619)	CGGGCAGCGGGCGGGCGGGCGGGCGGG
REST (4)	25 bp (-637 → -613)	GCGGGCGGGCGGGCGGGCGGGCGGGCGGG
REST (5)	25 bp (-634 → -610)	GCGGGCGGGCGGGCGGGCGGGCGGGCAG
REST (6)	21 bp (-584 → -564)	GGCAGCAGGACGAGCAGCGGC
CaRE	11 bp (-495 → -485)	GAATCGAGGCG

6.2. Regulación del promotor de *CACNG2-DT* por la vía AMPc/PKA/CREB

A continuación, se procedió a la realización de experimentos preliminares para identificar sitios funcionales de unión a factores de transcripción en la secuencia del promotor de interés. Esta caracterización se inició con el factor de transcripción CREB, dado que, como ya mencionó, el trabajo de Corney y sus colaboradores (2019)

mostró que el promotor en sentido podría ser susceptible de regulación por dicho factor de transcripción. Así que, para analizar más a fondo las propiedades del promotor del gen *CACNG2-DT*, la construcción de longitud completa clonada en el vector pGL3-Basic se transfectó en células N1E-115 que se trataron con 8-Br-AMPC (3 mM) y se realizaron ensayos de luciferasa. Los resultados muestran que el promotor exhibió una mayor actividad transcripcional después del tratamiento con 8-Br-AMPC que en ausencia del nucleótido cíclico (Fig. 11).

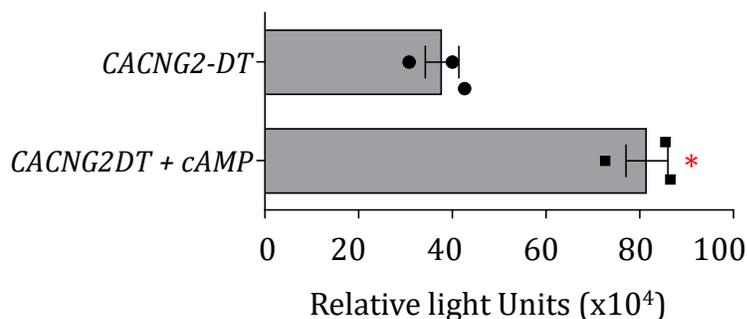


Figura 11. Regulación de la actividad transcripcional del promotor *CACNG2-DT* por AMPc. Ensayos de luciferasa en células N1E-115 transfectadas con la construcción del promotor en pGL3-Basic, mantenidas en cultivo en presencia y en ausencia de 8-Br-AMPC (3 mM). La actividad de la luciferasa, que refleja la actividad transcripcional del promotor *CACNG2-DT*, es significativamente mayor cuando las células se incuban en presencia del nucleótido cíclico. El asterisco denota diferencias estadísticamente significativas (prueba t de Student; $P < 0.001$; $n = 3$).

Para comenzar con el estudio del mecanismo molecular por el cual el AMPc actúa sobre el promotor, a continuación, se analizó el efecto del silenciamiento de la proteína de unión al elemento de respuesta del AMPc (CREB) sobre la actividad transcripcional. CREB es un factor de transcripción que se une a secuencias de ADN

(elementos de respuesta de AMPc) y regula la transcripción posterior de varios genes. Por lo tanto, las células N1E-115 se transfectaron con el promotor *CACNG2-DT* y los ARN de interferencia pequeños (siRNAs, por sus siglas en inglés) diseñados para silenciar CREB. Posteriormente, las células se incubaron con 8-Br-AMPc para estimular la fosforilación de CREB y se analizaron para determinar la actividad transcripcional mediante ensayos de luciferasa (Fig. 12). Los resultados de este análisis no indicaron cambios significativos en la actividad transcripcional del promotor en ausencia de AMPc. Sin embargo, hubo un aumento significativo después del tratamiento con el nucleótido cíclico. De manera interesante, dicho aumento se previene mediante la transfección de las células con ARNip dirigidos contra CREB (Fig. 12).

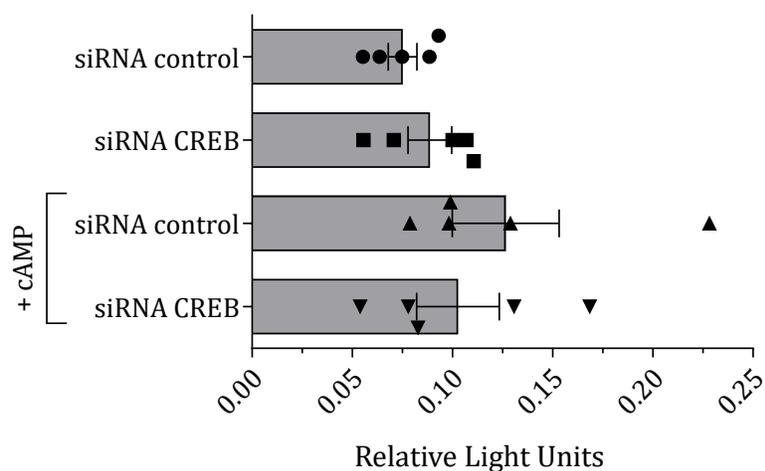


Figura 12. Actividad transcripcional del promotor *CACNG2-DT* y regulación por AMPc y CREB. Ensayos de luciferasa en extractos de proteínas de células N1E-115 transfectadas con ARNip control y contra CREB en presencia o ausencia de AMPc. El asterisco denota diferencias estadísticamente significativas (prueba t de Student; $P < 0.05$; $n = 5$).

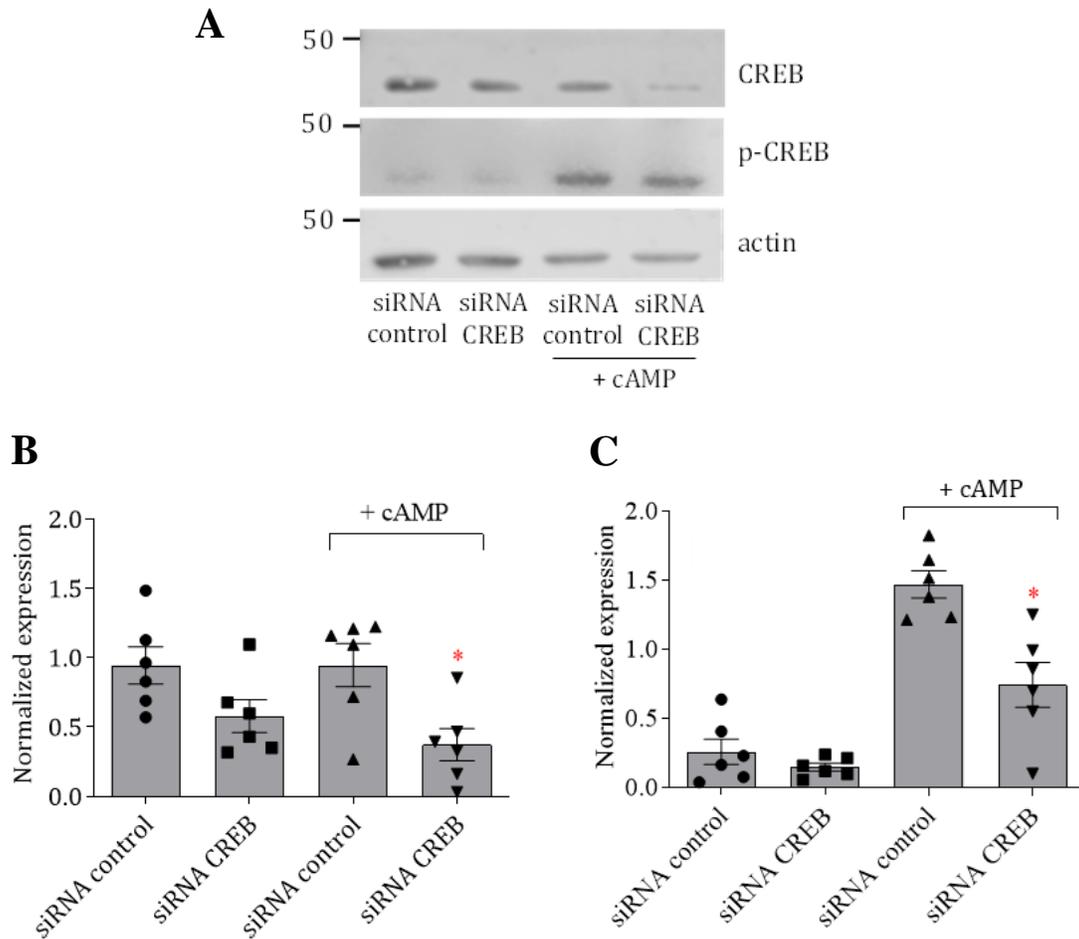


Figura 13. Silenciamiento de CREB y regulación por AMPc de su expresión funcional. (A) Ensayos de inmunoelctrotransferencia (*Western blot*) de la expresión de CREB y su forma fosforilada (p-CREB) en presencia y ausencia de AMPc. La expresión de actina se utilizó como control de carga. Comparación de los resultados de la expresión de CREB (B) y p-CREB (C). Los asteriscos denotan diferencias estadísticamente significativas (prueba t de Student; $P < 0.05$; $n = 6$).

Para corroborar el correcto silenciamiento de CREB, a continuación, se analizó la expresión del factor de transcripción por *Western blot* tanto en su forma inactiva como fosforilada (p-CREB). Los resultados mostraron que la transfección con los ARNip contra CREB provoca una disminución en la expresión del factor de transcripción en presencia y ausencia de 8-Br-AMPc (Fig. 13A y 13B). Por otro lado,

la expresión de p-CREB fue mínima en células no estimuladas con AMPc. Estos niveles aumentaron significativamente en presencia del nucleótido cíclico, efecto que disminuye en presencia de los ARNip contra CREB (Fig. 13A y 13C). Estos datos sugieren que el AMPc está estimulando la actividad del promotor del gen *CACNG2-DT* actuando a través del factor de transcripción CREB en su forma activa (p-CREB).

Para confirmar la participación de CREB en la regulación del promotor, a continuación, se transfectó una construcción que contenía la secuencia de CREB humano clonada en el vector pcDNA3 (pcDNA3-CREB1) en las células N1E-115, para evaluar el efecto de la sobreexpresión de CREB sobre la actividad del promotor. Los resultados indican que la actividad transcripcional en las células transfectadas fue mayor que en las células no transfectadas (Fig. 14B). Además, para obtener información sobre la posible vía de señalización utilizada por el AMPc para aumentar la transcripción, las células se incubaron en presencia de forskolina (FSK), un activador de la adenilato ciclasa (AC), y H89, un inhibidor de la proteína cinasa A (PKA). Los resultados mostraron que las células tratadas con FSK (10 μ M) tienen una mayor capacidad para iniciar la transcripción que células que no recibieron ningún tipo de tratamiento (Fig. 14A). Por el contrario, las células tratadas con H89 (10 μ M) tienen una menor capacidad para iniciar la transcripción incluso en presencia de pcDNA3-CREB1 (Fig. 14B). Estos hallazgos sugieren un mecanismo que implica la activación de AC por receptores acoplados a proteína G y la fosforilación corriente abajo por PKA.

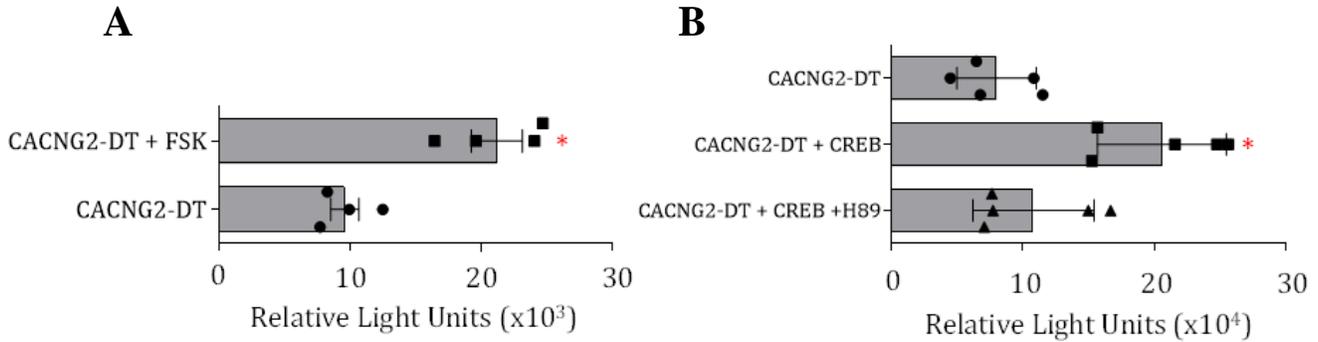


Figura 14. Efecto de la activación de la AC, la sobreexpresión de CREB y la inhibición de la PKA sobre la actividad transcripcional del promotor del gen *CACNG2-DT*. A) La incubación con forskolina (FSK) provocan un aumento significativo en la actividad transcripcional del promotor. B) La sobreexpresión de CREB igualmente provoca un aumento en la actividad transcripcional que se previene con la incubación con el inhibidor de la PKA, H89. Los asteriscos denotan diferencias estadísticamente significativas (prueba t de Student; $P < 0.05$; $n = 4-6$).

Asimismo, en el caso del tratamiento con H89, los cambios en la expresión de los niveles de proteína CREB y p-CREB se confirmaron mediante *Western blot* 48 h después de la transfección (Fig. 15A y 15B). La Figura 15B muestra que la transfección con pcDNA3-CREB1 aumentó significativamente p-CREB, sin afectar los niveles de CREB, porque la mayor parte de CREB ya se había fosforilado antes de extraer las proteínas para el ensayo. También se observó que el tratamiento con H89 previene cambios en la expresión de CREB y p-CREB, a pesar de haberse transfectado la construcción que aumenta la expresión de CREB. Estos resultados

sugieren que la vía de señalización AMPc-PKA-CREB puede ser responsable de aumentar la actividad transcripcional del promotor *CACNG2-DT*.

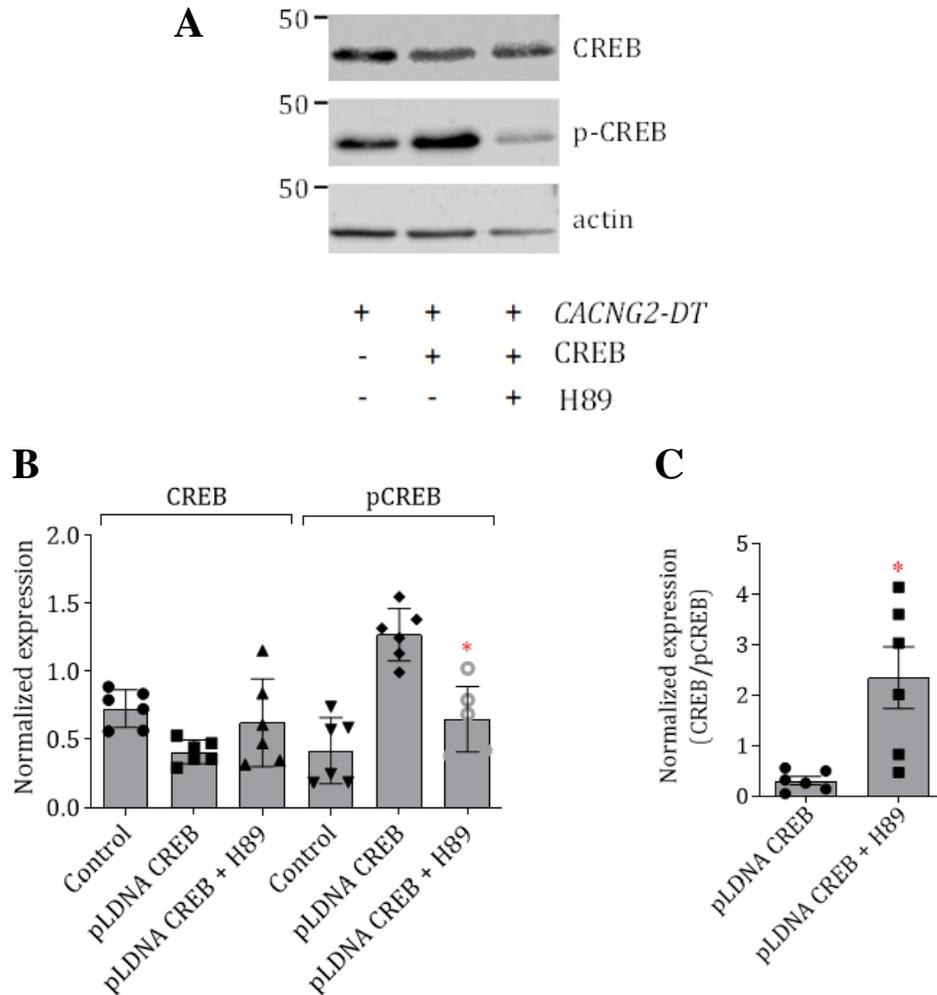
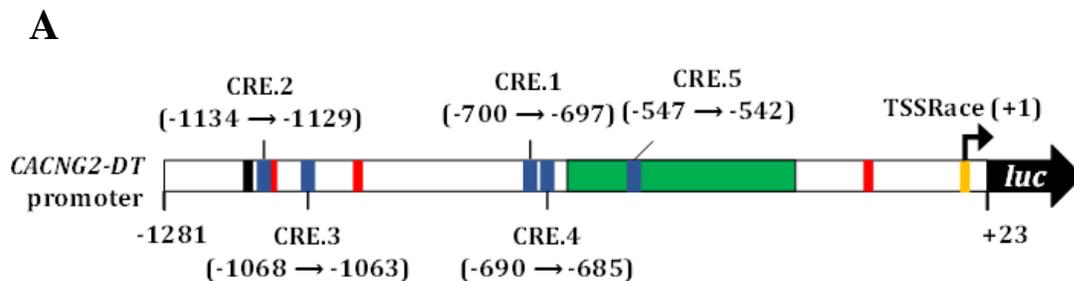


Figura 15. Efecto de la inhibición de PKA en la activación de CREB. A) Imagen de un ensayo representativo de Western blot de la expresión de CREB y p-CREB 48 h después de la transfección. B) Comparación de los resultados normalizados de expresión de CREB y p-CREB como en (A). La expresión de actina se empleó como control de carga. C) Comparación de los cambios en la relación CREB/p-CREB después del tratamiento con H89 como en (B). El tratamiento con el inhibidor de PKA aumenta significativamente la relación CREB/p-CREB, lo que indica que en esta afección se prefiere la forma no activa de CREB. Los asteriscos denotan diferencias estadísticamente significativas (prueba t de Student; $P < 0.001$; $n = 6$).

A continuación, dado que las células se transfectaron con la construcción de CREB, resultó interesante analizar los cambios en la relación CREB/p-CREB y comparar esta relación entre los grupos control y tratado con H89. Los resultados de este análisis se muestran en la Figura 15C, donde se puede observar que en presencia del inhibidor de PKA, la relación CREB/p-CREB es significativamente mayor, lo que indica que esta condición favorece la presencia de la forma no activa de CREB.

Con el fin de identificar los sitios de unión a CREB en la secuencia del promotor, se realizó un análisis *in silico*. Este análisis permitió identificar cinco sitios en el promotor (Fig. 16A) que luego se eliminaron individualmente mediante mutagénesis sitio-dirigida. A continuación, las construcciones mutantes se transfectaron en células N1E-115 y se analizaron mediante ensayos de luciferasa en presencia de 8-Br-AMPC. Este análisis mostró que las construcciones con la eliminación de los sitios CRE.2 y CRE.5 tuvieron una actividad transcripcional significativamente menor (Fig. 16B).



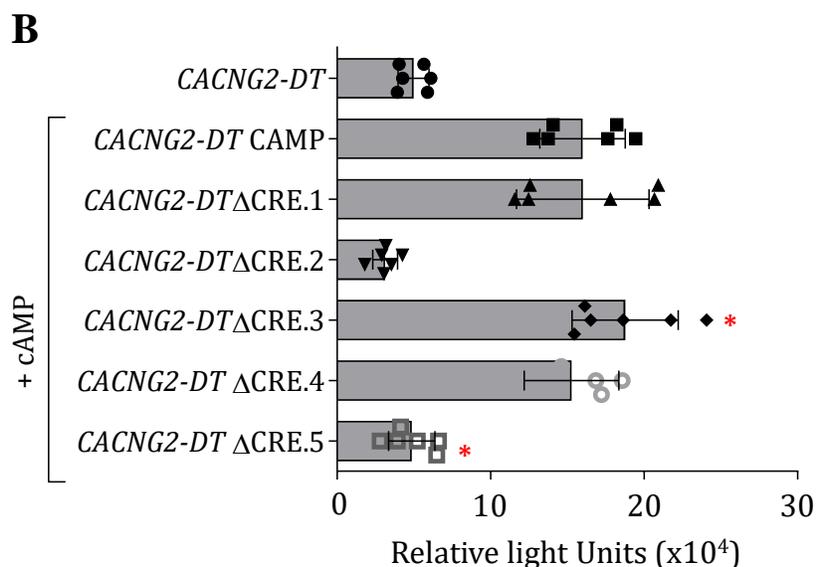


Figura 16. Evaluación de los sitios de unión de CREB en el promotor del gen *CACNG2-DT*. A) Esquema del promotor que indica la ubicación de los sitios de unión de CREB (CRE). B) Ensayo de luciferasa en condiciones de sobreexpresión de CREB (+ CREB) que muestra la actividad transcripcional de las construcciones con la eliminación de los sitios de unión de CREB. Los asteriscos denotan diferencias estadísticamente significativas (prueba t de Student; $P < 0.001$; $n = 6$).

6.3. Identificación experimental del TSS en el promotor del gen *CACNG2-DT*

A continuación, y como una parte esencial de la caracterización inicial del promotor, se determinó experimentalmente el sitio de inicio de la transcripción (TSS). Aunque el análisis *in silico* identificó tres TSS potenciales en el promotor, se procedió a determinar la ubicación del TSS funcional utilizando ARN aislado de células SHSY-5Y y el cerebelo humano. En estos experimentos se obtuvieron amplicones de ~150 pb (Fig. 17), y la secuenciación reveló que eran el mismo producto. Cuando la

secuencia de estos amplicones se alineó con la secuencia teórica del promotor, se identificó un TSS en la posición +1 (TSSRace).

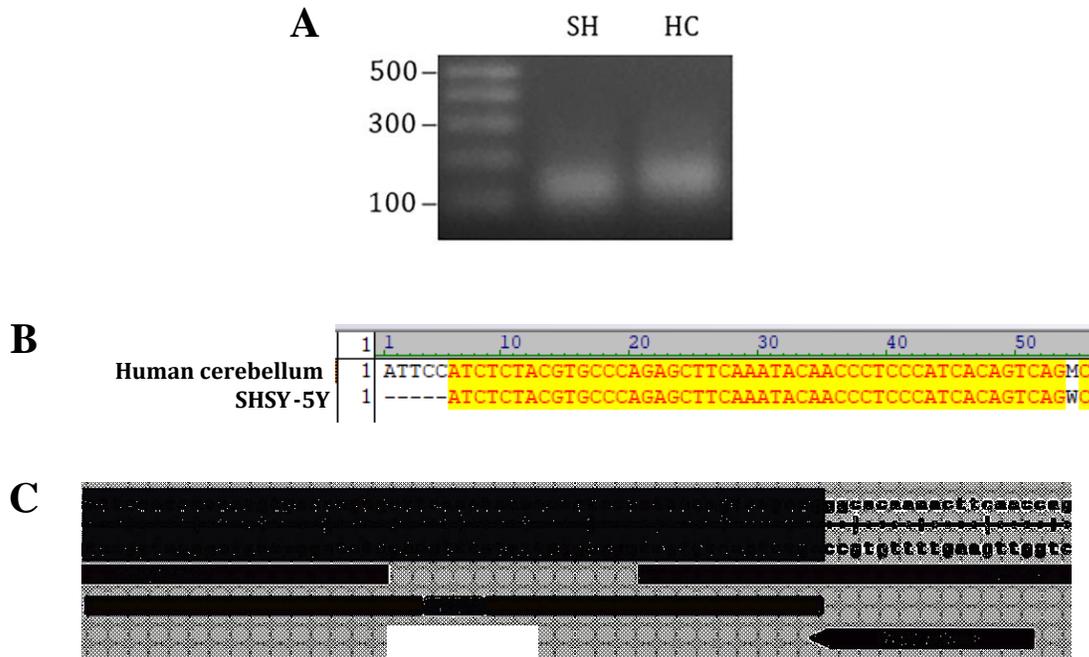


Figura 17. Identificación del TSS en el promotor del gen *CACNG2-DT* con la técnica de 5'RACE. Como resultado del experimento hecho con células SHSY-5Y (SH) y tejido de cerebelo humano (HC) se obtuvieron amplicones de ~150 pb con los que se identificó un posible TSS. A) Gel de agarosa en el que se analizaron los productos del ensayo. B) Alineamiento de las secuencias de los amplicones, donde se muestra que se trata del mismo producto a pesar de tener origen distinto. C) Localización del posible TSS en la posición +1 (véase Fig. 9), la identificación se basó en el alineamiento de la secuencia de los amplicones y la secuencia teórica del promotor. Abreviaturas: Fragment C, fragmento C del promotor de *CACNG2-DT*; NGSP primer, sitio de unión del primer usado en el ensayo. Lnc E1, primer exón del producto del gen *CACNG2-DT*.

Como se mencionó anteriormente, el análisis delecional del promotor mostró que todas las construcciones evaluadas presentaron una actividad transcripcional baja en comparación con el promotor de longitud completa, excepto la construcción C, donde un se ubica posible TSS (TSS3), específicamente en la posición -150 de

acuerdo con el análisis *in silico*. Por esta razón, a continuación, se procedió a comparar su funcionalidad con la del TSS encontrado experimentalmente (TSSRace) usando ensayos de luciferasa, antes y después de haber eliminado ambos sitios de forma independiente usando mutagénesis sitio-dirigida. Este análisis mostró que la eliminación del TSS3 no afecta la transcripción. En contraste, la eliminación del TSSRace disminuyó significativamente la capacidad del promotor para iniciar la transcripción (Fig. 18). Estos datos confirman la funcionalidad del TSSRace y muestran que la transcripción del gen *CACNG2-DT* comienza en la posición +1.

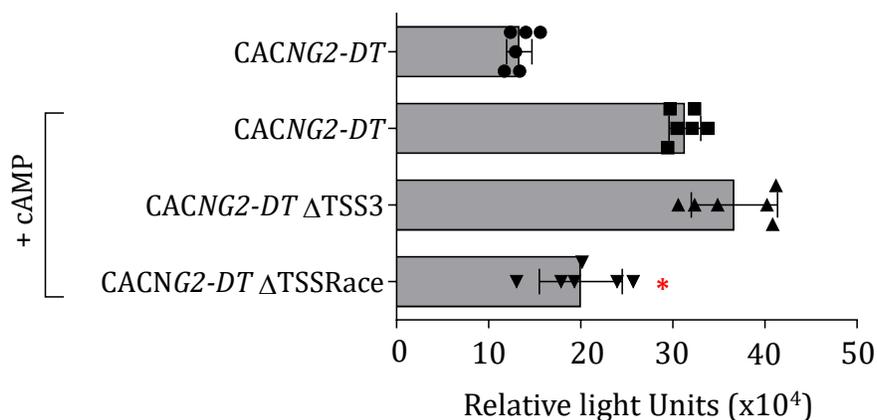


Figura 18. Análisis funcional del TSS encontrado experimentalmente en el promotor del gen *CACNG2-DT*. Ensayo de luciferasa de las construcciones promotoras con o sin el sitio TSS teórico (TSS3) y el experimental (TSSRace). Los ensayos se realizaron en condiciones de sobreexpresión de CREB (+ CREB). Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas (ANOVA; $P < 0.05$; $n = 6$).

7. Discusión

7.1. Elementos reguladores en el promotor de *CACNG2-DT*

Los ensayos de la actividad transcripcional a través de las deleciones del promotor en conjunto con el análisis *in silico* proporcionó evidencia del posible papel que el factor de transcripción REST (Garcia-Manteiga *et al.*, 2019) pudiera estar jugando en la regulación de la expresión de *CACNG2-DT*. Estos datos corroboran resultados previos que muestran la regulación directa del gen *Cacng2* de rata por REST (Corney *et al.*, 2019). El análisis aquí mostrado evidenció una región represora distal que contiene múltiples elementos REST en las posiciones -665 a -564 y un sitio consenso de unión para el elemento regulador dependiente de Ca^{2+} (CaRE) en la posición -495 a -485. La disminución de la actividad transcripcional observada en el análisis delecional (Fig. 10) podría ser una evidencia de la capacidad reguladora de estos elementos sobre la actividad promotora *in vivo*.

7.2. Control de la transcripción de un ARN largo no codificante (*CACNG2-DT*)

Por otro lado, en el genoma de rata se ha reportado que el gen *Cacng2* que codifica *Cavγ2/Stg*, en dirección opuesta, da lugar a dos ARNlnc de 405 y 578 pb (Coney *et al.*, 2019). Sin embargo, en el presente estudio fue posible identificar experimentalmente solo un TSS, ubicado en la posición +1 del promotor del gen de interés, y que controla la expresión de un ARNlnc (*CACNG2-DT*; *NR_134623.1*) de 556 pb. Cabe mencionar, sin embargo, que el análisis *in silico* utilizando la base de

datos Ensembl sugiere la presencia de un TSS adicional en la posición -57 que controlaría la expresión de una isoforma de 855 pb (ENST00000430281.3). Sin embargo, en el presente estudio no fue posible confirmar experimentalmente la presencia de tal sitio. El motivo de esta discrepancia no se conoce, sin embargo, puede deberse al hecho de que esta isoforma podría no estar expresada en la línea celular o el tejido utilizado en nuestro estudio. Sin embargo, vale la pena señalar que el TSS y la isoforma mencionada anteriormente solo se han encontrado *in silico*. Hasta donde sabemos, aún no se ha proporcionado evidencia experimental al respecto.

7.3. Regulación de la actividad transcripcional por la vía AMPc/PKA/p-CREB

Del mismo modo, la regulación transcripcional a través de la unión de factores de transcripción al elemento de respuesta de AMPc (CRE) corriente abajo de la señalización de AMPc juega un papel importante en muchos procesos celulares. Buena parte de los factores de transcripción que se unen a CRE, como la proteína de unión a CRE (CREB), se activan mediante la fosforilación mediada por PKA dependiente de AMPc y estimulan la expresión génica reclutando coactivadores. Aquí se proporcionan evidencias experimentales del papel de CREB en la regulación de la expresión de *CACNG2-DT*. Específicamente, el análisis de los resultados de los ensayos de mutagénesis sitio dirigida muestran que los sitios CREB.2 y CREB.5 regulan la actividad del promotor. Cabe mencionar que la presencia de sitios CRE funcionales implica la activación de receptores de membrana acoplados a proteínas G

triméricas y la subsiguiente activación de proteínas cinasas que fosforilan múltiples proteínas diana.

De manera interesante, en el caso de los canales de Ca_v , se sabe que su actividad está regulada por una amplia gama de GPCRs, incluidos los activados por GABA, glutamato, dopamina y opioides (Yan *et al.*, 1997; Kammermeier *et al.*, 2000; Castro *et al.*, 2007; Currie, 2010; Weiss *et al.*, 2011; Weiss & Zamponi, 2021). Dos mecanismos con diferentes escalas de tiempo median en esta regulación. El primero es un mecanismo agudo en el que el dímero $G\beta\gamma$ puede interactuar directamente con la subunidad formadora del poro de los canales ($Ca_v\alpha_1$). De hecho, los estudios de estructura-función han mostrado que los canales de la clase Ca_v2 contienen un dominio de unión para $G\beta\gamma$ (Zamponi *et al.*, 1997; Huang & Zamponi, 2017; Furukawa *et al.*, 1998) y que la interacción entre ellos estabiliza los canales en el estado cerrado. Por otro lado, los canales también pueden ser regulados de forma aguda por proteínas cinasas, uno de los efectores centrales de la activación de los GPCRs. Se sabe que todos los tipos de canales de Ca_v están regulados por fosforilación mediada por PKA, PKC o la proteína cinasa dependiente de Ca^{2+} /calmodulina (CaMK), entre otros (Zamponi *et al.*, 1997; Dai *et al.*, 2009; Huang & Zamponi, 2017).

Además de la modulación aguda de la actividad de los canales Ca_v por parte de los GPCRs, existe un segundo mecanismo que consiste en la modificación postraduccional que puede proporcionar cambios a largo plazo en la función de los canales y/o en su expresión en la membrana celular. En este caso, se sabe que la

activación de la cascada de señalización activada por los GPCRs puede dar lugar a modificaciones postraduccionales como glicosilación, ubiquitinación o procesamiento proteolítico de algunas de las subunidades que forman el complejo de canales (Weiss *et al.*, 2013; Ondakova *et al.*, 2016; Tétreault *et al.*, 2016).

Por otro lado, aquí se muestran evidencias que sugieren la presencia de un nuevo mecanismo de regulación de los canales Cav por los GPCRs que implica un efecto agudo a través de la activación de AC y la fosforilación de CREB por PKA, lo que eventualmente resulta en la regulación transcripcional a largo plazo del gen que codifica para *CACNG2-DT* y la subsiguiente regulación de la expresión funcional de Cav γ ₂/Stg como se discute más adelante (Fig. 19).

Vale la pena mencionar aquí que CREB tiene muchas funciones en diferentes órganos y tejidos, incluido el cerebro, donde su actividad está relacionada con el aprendizaje y la memoria (Wu *et al.*, 2007), y donde los receptores NMDA y AMPA juegan un papel decisivo. Por tanto, sería interesante investigar si la expresión de *CACNG2-DT* pudiera estar jugando un papel en este proceso. Por otro lado, investigar una asociación potencial de estos elementos CREB con fenotipos convulsivantes y de plasticidad relacionada con el dolor crónico en la que se ha implicado a Cav γ ₂/Stg (Nissenbaum, 2012; Letts *et al.*, 1998) también es un tema interesante para futuros estudios.

7.4. Regulación de la expresión de Cav γ ₂/Stg por *CACNG2-DT*

Otro aspecto que destacar tiene que ver con el carácter bidireccional del promotor. Es bien sabido que muchos promotores con esta característica pueden dar lugar a un ARN no codificante y a un mensajero codificante de proteínas (Adachi & Lieber, 2002; Jiménez-Badillo *et al.*, 2017). De manera interesante, existe evidencia de que los ARN no codificantes podrían modificar la expresión de la proteína codificada en la dirección opuesta (Wei, *et al.*, 2011), reforzando la idea de que el promotor del gen *CACNG2* es bidireccional y que uno de sus productos génicos es un ARNlnc. Este hallazgo proporciona además evidencia experimental de la co-expresión regulada por el par ARNlnc-proteína reportada para otros genes organizados de manera similar (Guttman & Rinn, 2012; Hombach & Kretz, 2016; Bridges *et al.*, 2021; Felix *et al.*, 2022).

Previamente en el laboratorio, la secuencia exónica del gen *CACNG2-DT* se transfectó en células SHSY-115, para posteriormente medir la expresión de la subunidad Cav γ ₂/Stg. Los resultados de este análisis sugieren que la presencia del ARNlnc induce un aumento significativo (~75%) en la expresión de Cav γ ₂/Stg (Muñoz-Herrera, 2018).

Aunque el mecanismo molecular por el cual *CACNG2-DT* aumenta la expresión funcional de la proteína Cav γ ₂/Stg sigue sin estar claro, existen varias posibilidades para explicarlo. Por un lado, el ARNlnc podría actuar en el núcleo regulando la maquinaria transcripcional. Además, *CACNG2-DT* podría estar involucrado en los procesos de regulación epigenética de la activación de la transcripción de genes

mediante la modulación de la accesibilidad a la cromatina (Guttman & Rinn, 2012; Hombach & Kretz, 2016; Bridges *et al.*, 2021). Por otro lado, una vez en el citoplasma, *CACNG2-DT* podría participar en diversos procesos moleculares, como la modulación de vías de traducción de señales que favorecen la expresión funcional de la proteína, la regulación de la estabilidad del ARNm y/o la regulación de la accesibilidad de miARNs que controlan su expresión (Guttman & Rinn, 2012; Hombach & Kretz, 2016; Bridges *et al.*, 2021). Todas estas posibilidades son atractivas para futuros estudios. Al respecto cabe mencionar que se sabe que los miARN pueden interactuar directamente con sitios complementarios en la región 3' no traducida de los ARNm diana y reprimir su expresión (Bushati & Cohen, 2007) y también con secuencias complementarias en la estructura de los ARNlnc. En este contexto, resulta razonable especular que *CACNG2-DT* podría interactuar con un miARN esponja que regulara a la baja la expresión funcional de $Ca_v\gamma_2/Stg$ y, por lo tanto, promoviera un aumento en los niveles de proteína (Fig. 19). Sin embargo, todavía se requiere evidencia experimental para apoyar esta idea.

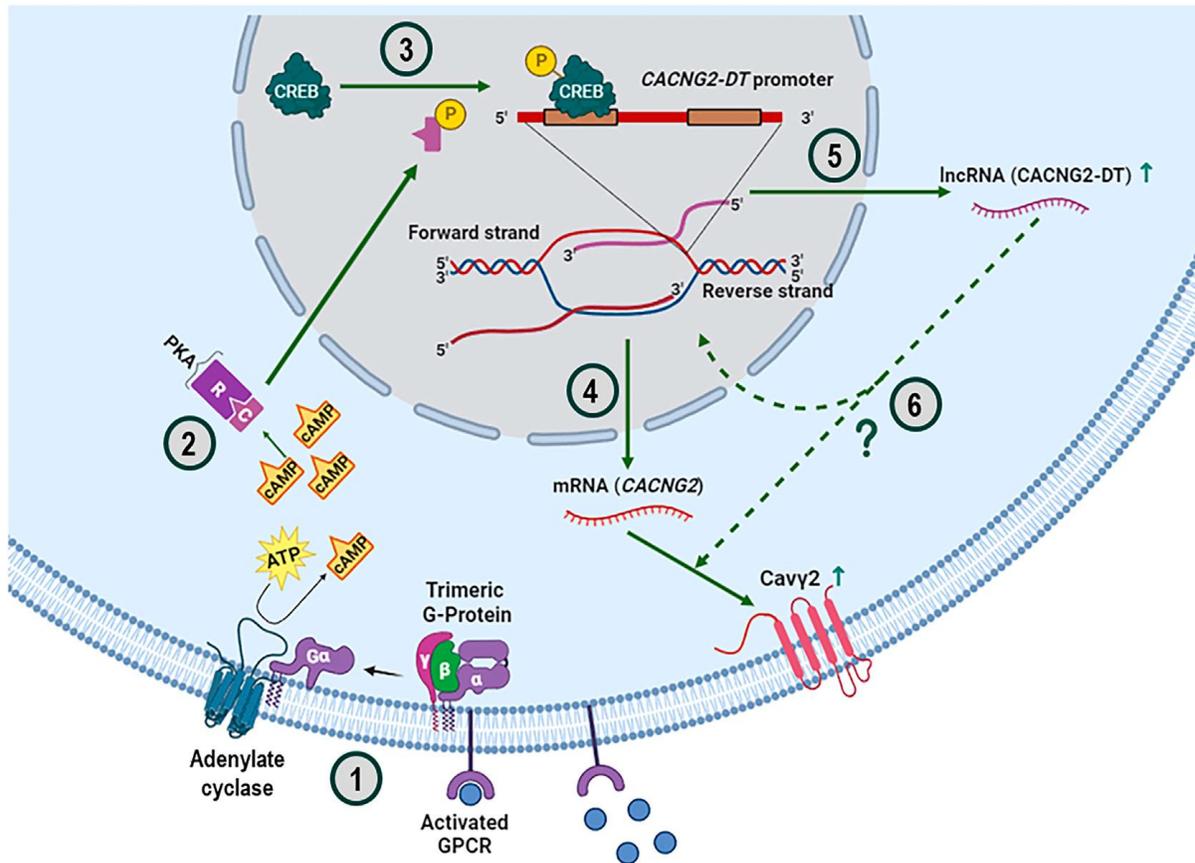


Figura 19. Esquema que describe de manera general la vía de señalización AMPc-PKA-CREB y su posible efecto en la regulación de la expresión de la subunidad *Cavy2/Stg*. La activación corriente arriba de los receptores acoplados a proteína G triméricas (GPCRs) da como resultado la disociación de la subunidad $G\alpha$, que se une y activa a la AC para producir el AMPc necesario para la señalización a través de la vía PKA (1). La PKA es una holoenzima tetramérica que comprende dos subunidades reguladoras (R) y dos catalíticas (C). Cuando el AMPc se une a las subunidades R, la enzima se disocia, lo que permite que las subunidades C fosforilen los sustratos (2). En este caso, las subunidades C en el núcleo fosforilan el factor de transcripción CREB en la serina 133, cambiándolo a su forma activa (3). Se sabe que CREB fosforilado se une a coactivadores para facilitar su interacción con los sitios CRE y la consecuente transcripción de genes diana (4) y, en sentido opuesto del genoma, da lugar al ARNlnc llamado *CACNG2-DT* (5). La sobreexpresión de este ARNlnc, por un mecanismo molecular aún desconocido, aumenta la expresión funcional de *Cavy2/Stg* (6).

7.5. Posibles repercusiones funcionales

Por último, desde un punto de vista funcional, un aumento en la expresión de Cav γ ₂/Stg podría tener implicaciones relevantes. En la membrana presináptica, la proteína puede interactuar con los canales Cav (Kang *et al.*, 2001; Kang & Campbell, 2003; Sandoval *et al.*, 2007). En consecuencia, podría inhibir la liberación de neurotransmisores, incluido el glutamato. En este caso, la presencia de *CACNG2-DT* favorecería la expresión de Cav γ ₂/Stg e intensificaría su acción inhibitoria sobre los canales. Por otro lado, en la membrana postsináptica, Cav γ ₂/Stg podría incrementar la expresión y actividad de los receptores glutamatérgicos tipo AMPA y contribuir a su acción despolarizante en la neurona postsináptica. Sin embargo, queda todavía mucho por determinar sobre el efecto de *CACNG2-DT* sobre estos canales y receptores.

Por otro lado, cabe recordar que la neurotransmisión depende en gran medida de la entrada de Ca²⁺ en todas las terminales sinápticas a través de canales de Cav. Y aunque la contribución de los canales de Cav de tipo L en la neurotransmisión no se ha establecido de manera inequívoca, cada vez más evidencia sugiere un papel para estas proteínas en la liberación de noradrenalina, dopamina y GABA. En particular, se sabe que la regulación de los canales de tipo L (Cav1.3) por la proteína quinasa dependiente de ciclina 5 (Cdk5) y su efecto sobre la liberación de GABA en la *sustancia negra pars reticulata* (SNpr; Loya-López *et al.*, 2020). Estos hallazgos resaltan el papel de los canales Cav1.3 en la liberación de GABA en la SNpr y en este contexto resulta provocador especular que también sobre una posible regulación por

CACNG2-DT actuando sobre la expresión de $Ca_v\gamma_2$ /Stg. Esto constituiría un novedoso mecanismo regulador de la neurotransmisión.

8. Conclusiones

La proteína $Ca_v\gamma_2$ /Stg es fundamental en la señalización neuronal debido a su asociación con los canales Ca_v y los receptores glutamatérgicos tipo AMPA. En consecuencia, no sorprende que las alteraciones en su expresión se asocien con trastornos neurológicos tan devastadores como la ataxia espinocerebelosa y la epilepsia con crisis de ausencia. Sin embargo, a pesar de su aparente relevancia funcional, la regulación en la expresión de $Ca_v\gamma_2$ /Stg no ha sido investigada en detalle. En el presente trabajo de tesis se muestran evidencia de que, 1) el promotor humano *CACNG2*, como en la rata, es bidireccional y regula la transcripción de un ARNlnc (llamado *CACNG2-DT*) en la dirección antisentido; 2) la vía de señalización AMPc-PKA/p-CREB está involucrada en la regulación transcripcional del gen *CACNG2-DT*; 3) la forma activa de CREB (p-CREB) podría estar regulando la actividad del promotor del gen que codifica *CACNG2-DT* a través de su unión a al menos dos sitios CREB y 4) el TSS está ubicado en la posición +1 del promotor del gen que codifica para *CACNG2-DT*.

Bibliografia

1. Adachi N, Lieber MR. Bidirectional gene organization: a common architectural feature of the human genome. *Cell*. 2002;109(7):807-9. doi: 10.1016/s0092-8674(02)00758-4.
2. Black JL 3rd. The voltage-gated calcium channel gamma subunits: a review of the literature. *J Bioenerg Biomembr*. 2003;35(6):649-60. doi: 10.1023/b:jobb.0000008029.22650.c5.
3. Bortsov AV, Devor M, Kaunisto MA, Kalso E, Brufsky A, Kehlet H, Aasvang E, Bittner R, Diatchenko L, Belfer I. CACNG2 polymorphisms associate with chronic pain after mastectomy. *Pain*. 2019;160(3):561-568. doi: 10.1097/j.pain.0000000000001432.
4. Bridges MC, Daulagala AC, Kourtidis A. LNCcation: ARNInc localization and function. *J Cell Biol*. 2021;220(2):e202009045. doi: 10.1083/jcb.202009045.
5. Bushati N, Cohen SM. microRNA functions. *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol*. 2007;23:175-205. doi: 10.1146/annurev.cellbio.23.090506.123406.
6. Castro A, Aguilar J, Elias D, Felix R, Delgado-Lezama R. G-protein-coupled GABA_B receptors inhibit Ca²⁺ channels and modulate transmitter release in descending turtle spinal cord terminal synapsing motoneurons. *J Comp Neurol*. 2007; 503:642-54. doi: 10.1002/cne.21421.
7. Chen RS, Deng TC, Garcia T, Sellers ZM, Best PM. Calcium channel gamma subunits: a functionally diverse protein family. *Cell Biochem Biophys*. 2007;47(2):178-86. doi: 10.1007/s12013-007-0002-0.

8. Corney BPA, Widnall CL, Rees DJ, Davies JS, Crunelli V, Carter DA. Regulatory Architecture of the neuronal *Cacng2/Tarpy2* gene promoter: multiple repressive domains, a polymorphic regulatory short tandem repeat, and bidirectional organization with co-regulated ARNlnc s. *J Mol Neurosci*. 2019;67(2):282-294. doi: 10.1007/s12031-018-1208-x. Epub 2018 Nov 26.
9. Currie KP. G protein modulation of Ca_v2 voltage-gated calcium channels. *Channels (Austin)*. 2010;4(6):497-509. doi: 10.4161/chan.4.6.12871.
10. Dai S, Hall DD, Hell JW. Supramolecular assemblies and localized regulation of voltage-gated ion channels. *Physiol Rev*. 2009;89(2):411-52. doi: 10.1152/physrev.00029.2007.
11. Felix R. Insights from mouse models of absence epilepsy into Ca^{2+} channel physiology and disease etiology. *Cell Mol Neurobiol*. 2002;22(2):103-20. doi: 10.1023/a:1019807719343.
12. Felix R, Calderón-Rivera A, Andrade A. Regulation of high-voltage-activated Ca^{2+} channel function, trafficking, and membrane stability by auxiliary subunits. *Wiley Interdiscip Rev Membr Transp Signal*. 2013;2(5):207-220. doi: 10.1002/wmts.93.
13. Felix R, Muñoz-Herrera D, Corzo-López A, Fernández-Gallardo M, Leyva-Leyva M, González-Ramírez R, Sandoval A. Ion channel long non-coding RNAs in neuropathic pain. *Pflugers Arch*. 2022;474(4):457-468. doi: 10.1007/s00424-022-02675-x.

14. Furukawa T, Nukada T, Mori Y, Wakamori M, Fujita Y, Ishida H, Fukuda K, Kato S, Yoshii M. Differential interactions of the C terminus and the cytoplasmic I-II loop of neuronal Ca²⁺ channels with G-protein alpha and beta gamma subunits. I. Molecular determination. *J Biol Chem.* 1998;273(28):17585-94. doi: 10.1074/jbc.273.28.17585.
15. Garcia-Manteiga JM, D'Alessandro R, Meldolesi J. News about the Role of the Transcription Factor REST in Neurons: From Physiology to Pathology. *Int J Mol Sci.* 2019;21(1):235. doi: 10.3390/ijms21010235.
16. Guttman M, Rinn JL. Modular regulatory principles of large non-coding RNAs. *Nature.* 2012;482(7385):339-46. doi: 10.1038/nature10887.
17. Hamdan FF, Gauthier J, Araki Y, Lin DT, Yoshizawa Y, Higashi K, Park AR, Spiegelman D, Dobrzeniecka S, Piton A, Tomitori H, Daoud H, Massicotte C, Henrion E, Diallo O; S2D Group; Shekarabi M, Marineau C, Shevell M, Maranda B, Mitchell G, Nadeau A, D'Anjou G, Vanasse M, Srour M, Lafrenière RG, Drapeau P, Lacaille JC, Kim E, Lee JR, Igarashi K, Haganir RL, Rouleau GA, Michaud JL. Excess of de novo deleterious mutations in genes associated with glutamatergic systems in nonsyndromic intellectual disability. *Am J Hum Genet.* 2011;88(3):306-16. doi: 10.1016/j.ajhg.2011.02.001.
18. Hombach S, Kretz M. Non-coding RNAs: classification, biology and functioning. *Adv Exp Med Biol.* 2016;937:3-17. doi: 10.1007/978-3-319-42059-2_1.

19. Huang J, Zamponi GW. Regulation of voltage gated calcium channels by GPCRs and post-translational modification. *Curr Opin Pharmacol.* 2017;32:1-8. doi: 10.1016/j.coph.2016.10.001.
20. Huganir RL, Nicoll RA. AMPARs and synaptic plasticity: the last 25 years. *Neuron.* 2013;80(3):704-17. doi: 10.1016/j.neuron.2013.10.025.
21. Jiménez-Badillo SE, Oviedo N, Hernández-Guzmán C, González-Mariscal L, Hernández-Sánchez J. Catsper1 promoter is bidirectional and regulates the expression of a novel ARNlnc. *Sci Rep.* 2017;7(1):13351. doi: 10.1038/s41598-017-13867-2.
22. Kamalova A, Nakagawa T. AMPA receptor structure and auxiliary subunits. *J Physiol.* 2021;599(2):453-469. doi: 10.1113/JP278701.
23. Kammermeier PJ, Xiao B, Tu JC, Worley PF, Ikeda SR. Homer proteins regulate coupling of group I metabotropic glutamate receptors to N-type calcium and M-type potassium channels. *J Neurosci.* 2000;20(19):7238-45. doi: 10.1523/JNEUROSCI.20-19-07238.2000.
24. Kang MG, Campbell KP. Gamma subunit of voltage-activated calcium channels. *J Biol Chem.* 2003;278(24):21315-8. doi: 10.1074/jbc.R300004200.
25. Kang MG, Chen CC, Felix R, Letts VA, Frankel WN, Mori Y, Campbell KP. Biochemical and biophysical evidence for γ_2 subunit association with neuronal voltage-activated Ca^{2+} channels. *J Biol Chem.* 2001;276(35):32917-24. doi: 10.1074/jbc.M100787200.

26. Letts VA. Stargazer--a mouse to seize! *Epilepsy Curr.* 2005;5(5):161-5. doi: 10.1111/j.1535-7511.2005.00051.x.
27. Letts VA, Felix R, Biddlecome GH, Arikath J, Mahaffey CL, Valenzuela A, Bartlett FS 2nd, Mori Y, Campbell KP, Frankel WN. The mouse stargazer gene encodes a neuronal Ca^{2+} -channel gamma subunit. *Nat Genet.* 1998;19(4):340-7. doi: 10.1038/1228.
28. Liu YL, Fann CS, Liu CM, Chen WJ, Wu JY, Hung SI, Chen CH, Jou YS, Liu SK, Hwang TJ, Hsieh MH, Chang CC, Yang WC, Lin JJ, Chou FH, Faraone SV, Tsuang MT, Hwu HG. RASD2, MYH9, and CACNG2 genes at chromosome 22q12 associated with the subgroup of schizophrenia with non-deficit in sustained attention and executive function. *Biol Psychiatry.* 2008;64(9):789-96. doi: 10.1016/j.biopsych.2008.04.035.
29. Loya-López S, Sandoval A, González-Ramírez R, Calderón-Rivera A, Ávalos-Fuentes A, Rodríguez-Sánchez M, Caballero R, Tovar-Soto D, Felix R, Florán B. Cdk5 phosphorylates Cav1.3 channels and regulates GABA_A-mediated miniature inhibitory post-synaptic currents in striato-nigral terminals. *Biochem Biophys Res Commun.* 2020;524(1):255-261. doi: 10.1016/j.bbrc.2020.01.084.
30. Martínez-Hernández E, González-Ramírez R, Sandoval A, Cisneros B, Delgado-Lezama R, Felix R. Isolation and characterization of the 5'-upstream region of the human voltage-gated Ca^{2+} channel $\alpha_2\delta$ -1 auxiliary subunit gene:

- promoter analysis and regulation by transcription factor Sp1. *Pflugers Arch.* 2013;465(6):819-28. doi: 10.1007/s00424-012-1194-8.
31. Muñoz-Herrera D. Caracterización del promotor antisentido del gen *CACNG2*. Tesis de Maestría. Departamento de Biología Celular, Cinvestav. 2018 pp. 74.
32. Nanou E, Catterall WA. Calcium channels, synaptic plasticity, and neuropsychiatric disease. *Neuron.* 2018;98(3):466-481. doi: 10.1016/j.neuron.2018.03.017.
33. Ninomiya W, Mizobuchi K, Hayashi T, Okude S, Katagiri S, Kubo A, Masuhara N, Nakano T. Electroretinographic abnormalities associated with pregabalin: a case report. *Doc Ophthalmol.* 2020;140(3):279-287. doi: 10.1007/s10633-019-09743-1.
34. Nissenbaum J. From mouse to humans: discovery of the *CACNG2* pain susceptibility gene. *Clin Genet.* 2012;82(4):311-20. doi: 10.1111/j.1399-0004.2012.01924.x.
35. Nissenbaum J, Devor M, Seltzer Z, Gebauer M, Michaelis M, Tal M, Dorfman R, Abitbul-Yarkoni M, Lu Y, Elahipanah T, delCanho S, Minert A, Fried K, Persson AK, Shpigler H, Shabo E, Yakir B, Pisanté A, Darvasi A. Susceptibility to chronic pain following nerve injury is genetically affected by *CACNG2*. *Genome Res.* 2010;20(9):1180-90. doi: 10.1101/gr.104976.110.
36. Ondacova K, Karmazinova M, Lazniewska J, Weiss N, Lacinova L. Modulation of Cav3.2 T-type calcium channel permeability by asparagine-

- linked glycosylation. *Channels (Austin)*. 2016;10(3):175-84. doi: 10.1080/19336950.2016.1138189.
37. Osten P, Stern-Bach Y. Learning from stargazin: the mouse, the phenotype and the unexpected. *Curr Opin Neurobiol*. 2006;16(3):275-80. doi: 10.1016/j.conb.2006.04.002.
38. Pirotte B, Francotte P, Goffin E, de Tullio P. AMPA receptor positive allosteric modulators: a patent review. *Expert Opin Ther Pat*. 2013;23(5):615-28. doi: 10.1517/13543776.2013.770840.
39. Popescu GK. Accessories assist AMPA receptors to close pockets. *J Gen Physiol*. 2015;145(1):17-21. doi: 10.1085/jgp.201411320.
40. Sandoval A, Andrade A, Beedle AM, Campbell KP, Felix R. Inhibition of recombinant N-type Ca_v channels by the γ_2 subunit involves unfolded protein response (UPR)-dependent and UPR-independent mechanisms. *J Neurosci*. 2007;27(12):3317-27. doi: 10.1523/JNEUROSCI.4566-06.2007.
41. Sharp AH, Black JL 3rd, Dubel SJ, Sundarraj S, Shen JP, Yunker AM, Copeland TD, McEnery MW. Biochemical and anatomical evidence for specialized voltage-dependent calcium channel gamma isoform expression in the epileptic and ataxic mouse, stargazer. *Neuroscience*. 2001;105(3):599-617. doi: 10.1016/s0306-4522(01)00220-2
42. Sumioka A. Auxiliary subunits provide new insights into regulation of AMPA receptor trafficking. *J Biochem*. 2013;153(4):331-7. doi: 10.1093/jb/mvt015.

43. Tétreault MP, Bourdin B, Briot J, Segura E, Lesage S, Fiset C, Parent L. Identification of glycosylation sites essential for surface expression of the Cav $\alpha_2\delta_1$ subunit and modulation of the cardiac Cav1.2 channel activity. *J Biol Chem.* 2016;291(9):4826-43. doi: 10.1074/jbc.M115.692178.
44. Tomita S, Adesnik H, Sekiguchi M, Zhang W, Wada K, Howe JR, Nicoll RA, Brecht DS. Stargazin modulates AMPA receptor gating and trafficking by distinct domains. *Nature.* 2005;435(7045):1052-8. doi: 10.1038/nature03624.
45. Wei W, Pelechano V, Järvelin AI, Steinmetz LM. Functional consequences of bidirectional promoters. *Trends Genet.* 2011;27(7):267-76. doi: 10.1016/j.tig.2011.04.002.
46. Weiss N, Black SA, Bladen C, Chen L, Zamponi GW. Surface expression and function of Cav3.2 T-type calcium channels are controlled by asparagine-linked glycosylation. *Pflugers Arch.* 2013;465(8):1159-70. doi: 10.1007/s00424-013-1259-3.
47. Weiss N, Sandoval A, Kyonaka S, Felix R, Mori Y, De Waard M. Rim1 modulates direct G-protein regulation of Cav2.2 channels. *Pflugers Arch.* 2011;461(4):447-59. doi: 10.1007/s00424-011-0926-5.
48. Weiss N, Zamponi GW. Opioid receptor regulation of neuronal voltage-gated calcium channels. *Cell Mol Neurobiol.* 2021;41(5):839-847. doi: 10.1007/s10571-020-00894-3.

49. Wu H, Zhou Y, Xiong ZQ. Transducer of regulated CREB and late phase long-term synaptic potentiation. *FEBS J.* 2007;274(13):3218-23. doi: 10.1111/j.1742-4658.2007.05891.x.
50. Yan Z, Song WJ, Surmeier J. D2 dopamine receptors reduce N-type Ca^{2+} currents in rat neostriatal cholinergic interneurons through a membrane-delimited, protein-kinase-C-insensitive pathway. *J Neurophysiol.* 1997;77(2):1003-15. doi: 10.1152/jn.1997.77.2.1003.
51. Zamponi GW, Bourinet E, Nelson D, Nargeot J, Snutch TP. Crosstalk between G proteins and protein kinase C mediated by the calcium channel $\alpha 1$ subunit. *Nature.* 1997;385(6615):442-6. doi: 10.1038/385442a0.
52. Zamponi GW, Striessnig J, Koschak A, Dolphin AC. The Physiology, pathology, and pharmacology of voltage-gated calcium channels and their future therapeutic potential. *Pharmacol Rev.* 2015;67(4):821-70. doi: 10.1124/pr.114.009654.